

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Eva Rmoutilová

Diverzita volně žijících diplomonád

Diversity of free-living diplomonads

Diplomová práce

Školitel:

doc. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4. 5. 2015

Eva Rmoutilová

Zde bych ráda poděkovala především svému školiteli doc. RNDr. Ivanu Čepičkovi, PhD. Děkuji Ti, Ivane, za trpělivost, kterou jsi se mnou měl, a za nezanedbatelné množství času a energie, které jsi věnoval tomu, abys mě dovedl ke zdárnému dokončení této práce. Tvá námaha nebude zapomenuta.

Mé velké díky patří také mojí konzultantce Mgr. Elišce Zadrobílkové, která mi ukázala, co obnáší práce v laboratoři, a naučila mě vše, co bylo potřeba. Vždy měla pochopení pro mou nejistotu či omyly a s laskavostí sobě vlastní mi pokaždé ochotně pomohla nebo poradila.

Svůj vděk musím vyjádřit také zbytku našeho týmu, zejména Mgr. Petru Táborskému a Mgr. Tomáši Pánkovi, kteří na mě nikdy nešetřili dobrými radami. Díky za přátelskou atmosféru a motivující pracovní prostředí, kde jsem se vždy dobře cítila.

Nemohu zde samozřejmě opomenout ani své nejbližší. Děkuji svým rodičům, Šárce a Miroslavu Rmoutilovým, kteří mě po celý život ve všech ohledech podporují a umožňují mi směřovat svůj život směrem, kterým si přeji. Děkuji také svému bratrovi, Martinovi Rmoutilovi, který mi byl odmalička vzorem a inspirací. Nakonec děkuji i Vojtěchu Mazancovi za to, že to se mnou v závěrečných stádiích zoufalství vydržel.

Za to, že tato práce vznikla, vděčím také všem ochotným kolegům, kteří na svých pracovních cestách a dovolených nezapomínali na náš výzkum a vozili nám vzorky sedimentů z celého světa. Díky vám!

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| 1. Úvod a cíle práce | 8 |
| 2. Literární přehled..... | 10 |
| 2.1. Morfologie a ultrastruktura | 10 |
| 2.1.1. Unizoické vs. diplozoické diplomonády..... | 10 |
| 2.1.2. Struktura bičíkového aparátu | 11 |
| 2.2. Flagelární transformace u parazita <i>Giardia intestinalis</i> | 13 |
| 2.3. Deriváty mitochondrií diplomonád..... | 14 |
| 2.4. Postavení řádu Diplomonadida mezi eukaryoty..... | 15 |
| 2.5. Fylogeneze diplomonád | 16 |
| 2.6. Evoluce stavby buňky | 20 |
| 2.7. Evoluce způsobu života..... | 20 |
| 2.8. Taxonomie řádu Diplomonadida..... | 21 |
| 3. Metodika..... | 28 |
| 3.1. Sběr vzorků..... | 28 |
| 3.2. Kultivace | 28 |
| 3.2.1. Složení a příprava kultivačních médií..... | 28 |
| 3.3. Světelná mikroskopie..... | 30 |
| 3.3.1. Nativní preparáty | 30 |
| 3.3.2. Barvení protargolem dle Bodiana, modifikováno dle Nie (1950) a Ptáčková (2010) | 30 |
| 3.3.3. Fotodokumentace a měření buněk..... | 33 |
| 3.4. Molekulárně biologické techniky | 33 |
| 3.4.1. Izolace DNA | 33 |
| 3.4.2. Amplifikace, elektroforéza a purifikace | 34 |
| 3.4.3. Klonování DNA | 36 |
| 3.4.4. Sekvence DNA | 39 |

| | |
|--|----|
| 3.4.5. Fylogenetická analýza..... | 39 |
| 4. Výsledky | 41 |
| 4.1. Sběr a kultivace izolátů..... | 41 |
| 4.2. Fylogenetická analýza..... | 44 |
| 4.3. Morfologická charakterizace..... | 48 |
| 5. Diskuze | 60 |
| 5.1. Zhodnocení použitých metod..... | 60 |
| 5.1.1. Kultivace volně žijících diplomonád | 60 |
| 5.1.2. Izolace a amplifikace DNA..... | 61 |
| 5.1.3. Pořizování snímků živých buněk..... | 62 |
| 5.2 Určování druhů | 64 |
| 5.2.1 Určené druhy rodu <i>Trepomonas</i> | 65 |
| 5.2.2 Ostatní druhy rodu <i>Trepomonas</i> | 66 |
| 5.2.3 Rod <i>Hexamita</i> | 68 |
| 5.2.4 Rod <i>Gyromonas</i> | 68 |
| 5.3. Evoluce volně žijících diplomonád | 69 |
| 6. Závěrečné shrnutí..... | 73 |
| 7. Přehled použité literatury | 74 |

Abstrakt

Řád Diplomonadida patří do říše Excavata a zahrnuje jak volně žijící, tak endobiotické prvky. Více pozornosti bylo vždy věnováno endobiotickým zástupcům – zejména parazitu *Giardia intestinalis*, na kterém bylo provedeno velké množství studií. Diplomonády jsou anaerobní a postrádají aerobní mitochondrii, mají pouze redukované mitochondriální deriváty, hydrogenosomy nebo mitosomy. Podle stavby buňky se rozlišují unizoické (jeden karyomastigont) a diplozoické (dva propojené karyomastigonty). Evoluce stavby jejich buňky zůstává prozatím nevyřešena. Právě studium volně žijících diplomonád, kterým dosud bylo věnováno málo pozornosti, přitom může přispět k vyřešení tohoto problému. Diplomonády jsou významné i tím, že řada jejich zástupců je sekundárně volně žijící.

Tato práce je zaměřena na fylogenezi a morfologii volně žijících diplomonád. Díky rozsáhlé sbírce kultur se nám podařilo určit celkem nových 65 sekvencí SSU rDNA převážně volně žijících zástupců řádu Diplomonadida. Fylogenetická analýza ukázala, že rody *Trepomonas*, *Hexamita* a unizoické diplomonády nejsou monofyletické. Také zřejmě existuje několik linií, které obsahují jak endobiotické, tak volně žijící zástupce. Provedli jsme podrobnou morfologickou studii izolátů rodů *Trepomonas* a *Gyromonas*. U rodu *Hexamita* podrobná studie morfologie nebyla provedena kvůli metodickým obtížím. Podle literatury jsme rozpoznali celkem čtyři druhy rodu *Trepomonas* a jeden druh rodu *Gyromonas*. U trepomonád jsme objevili skupinu izolátů, které jsme nebyli schopni určit do druhu a které zřejmě představují tři nové druhy.

Klíčová slova: Diplomonadida, diplozoický, Excavata, *Gyromonas*, *Hexamita*, karyomastigont, *Trepomonas*, unizoický.

Abstract

Order Diplomonadida belongs to the supergroup Excavata and comprises both free-living and endobiotic protists. Until recently, research on diplomonads was focused mainly on endobiotic representatives, particularly the parasite *Giardia intestinalis*, which has been the object of interest of many studies. Diplomonads are anaerobic protists that lack aerobic mitochondria. Instead, they possess reduced mitochondrial derivatives – hydrogenosomes or mitosomes. According to the morphology, the diplomonads are divided into unizoid (single karyomastigont) and diplozoid ones (doubled karyomastigont). Evolution of the cell morphology of diplomonads still remains unclear, and a thorough study focused on free-living diplomonads can help to elucidate this problem. Besides, the diplomonads are interesting because many secondarily free-living representatives of this group exist.

This study is focused on the phylogeny and morphology of free-living diplomonads. We determined 65 new SSU rDNA sequences, mainly from free-living diplomonads. Phylogenetic analyses showed genera *Trepomonas* and *Hexamita* as well as unizoid diplomonads non-monophyletic. Also, several diplomonad lineages containing both free-living and endobiotic species were recovered. We conducted a detailed study of morphology of two genera, *Trepomonas* and *Gyromonas*. Morphological study of *Hexamita* was not possible because of methodological difficulties. We determined four trepomonad and one gyromonad species on the basis of available literature. We were unable to determine some of our *Trepomonas* lineages, which may represent three novel species.

Key words: Diplomonadida, diplozoid, Excavata, *Gyromonas*, *Hexamita*, karyomastigont, *Trepomonas*, unizoid.

1. Úvod a cíle práce

Předložená diplomová práce je zaměřena na volně žijící zástupce diplomonád (Diplomonadida), kteří byli, co do studovanosti, vždy zastiňováni svými parazitickými příbuznými. Nejznámější diplomonádou je lidský patogen *Giardia intestinalis*, prvok charakteristického vzhledu způsobující průjemová onemocnění. Rod *Giardia* má mnoho dalších druhů - všechny jsou endobiotické a nejčastějšími hostiteli jsou ptáci a savci. Napadají však i dobytek, méně pak studenokrevné živočichy. Ty napadají mnohem častěji zástupci rovněž velmi známého parazitického rodu *Spironucleus*, se kterými se potýkal mnohý akvarista. Naproti tomu studiu volně žijících diplomonád, které nezpůsobují zdravotní ani hospodářské problémy, se dosud věnovalo velmi málo pozornosti, ačkoliv jsou to v nejednom ohledu velmi zajímaví prvoci. Morfologické studie na volně žijících diplomonádách sice byly v minulosti provedeny, nicméně nikdy nebyly dány do souvislosti s relevantní fylogenetickou analýzou – generování molekulárních dat z těchto prvoků totiž dosud nebylo věnováno zásadní úsilí. Vzhledem k těmto okolnostem není jasné, zda jsou popsané druhy vůbec platné, o vztazích mezi nimi nemluvě. Důvodů pro studium těchto prvoků je přitom více než dost. Kvůli přesvědčení, že diplomonády na fylogenetickém stromě eukaryot zaujímají bazální postavení, a kvůli chybějící aerobní mitochondrii spadaly do dnes již neplatné říše Archezoa. Většina zástupců řádu Diplomonadida má pozoruhodnou zdvojenou morfologii, zbytek má morfologii „standardní“ – tento kontrast společně s dosavadními molekulárními daty vytváří zásadní otázku, jak vlastně evoluce morfologie diplomonád probíhala. A jak je to se způsobem života? Byly první diplomonády parazitické, nebo volně žijící?

Tyto a další otázky vyvstávají při bližším náhledu na volně žijící diplomonády. Aby ale bylo možné tyto otázky zodpovědět, je třeba provést morfologické studie skupiny, nasbírat molekulární data a provést fylogenetické analýzy. V této práci bude předložena kombinace morfologické a fylogenetické studie, která by měla osvětlit vnitřní vztahy volně žijících diplomonád a pomoci tak k budoucímu vysvětlení výše položených otázek.

V této práci budou používány následující počestěné názvy:

Pro řád Diplomonadida: název diplomonády (femininum, genitiv plurálu „diplomonád“).

Pro čeleď Enteromonadidae: název enteromonády (femininum, genitiv plurálu „enteromonád“).

Pro rod *Trepomonas*: název trepomonas (femininum, genitiv singuláru „trepomonády“).

Pro rod *Hexamita*: název hexamita (femininum, genitiv singuláru „hexamity“).

Pro rod *Gyromonas*: název gyromonas (femininum, genitiv singuláru „gyromonády“).

Pro rod *Giardia*: název giardia (femininum, genitiv singuláru „giardie“).

Cíle práce:

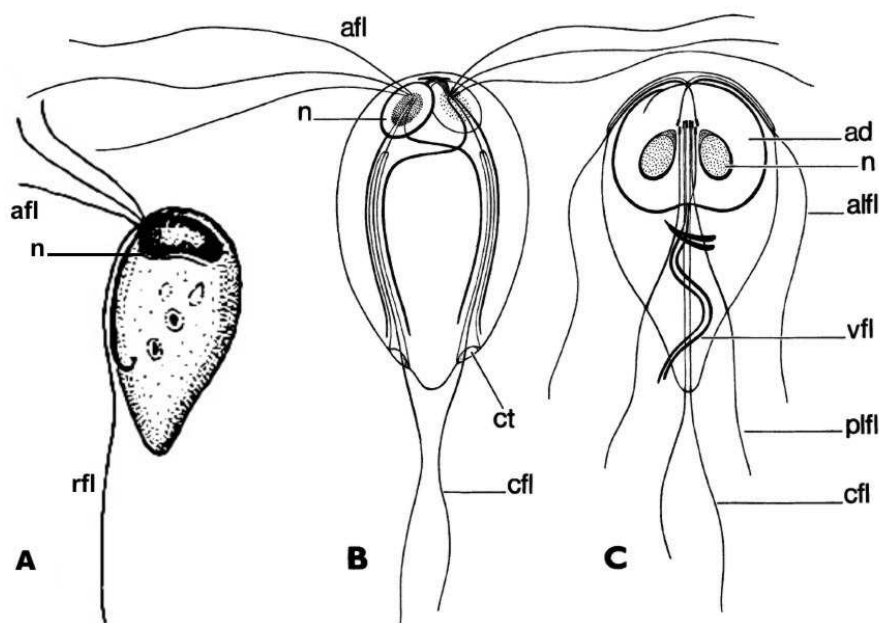
1. Získat co nejvíce izolátů volně žijících diplomonád a dlouhodobě je kultivovat.
2. Provést morfologickou studii pomocí světelné mikroskopie.
3. Získat co nejvíce sekvencí genu pro SSU rDNA.
4. Provést fylogenetickou analýzu.
5. Srovnat výsledky morfologické a fylogenetické studie.

2. Literární přehled

2.1. Morfologie a ultrastruktura

2.1.1. Unizoické vs. diplozoické diplomonády

Diplomonadida jsou bičíkovci, jejichž délka se pohybuje v rozmezí 5 – 35 μm (Kudo, 1931; Mylnikov, 1985). Nemají klasickou mitochondrii (více viz kapitolu Deriváty mitochondrií diplomonád), postrádají Golgiho aparát a nemají žádné povrchové šupiny ani schránku. Buňky jsou nejčastěji hruškovitého tvaru (Kudo, 1931) nebo jsou zploštělé a mají oválný nebo lehce spirálně zatočený tvar. Diplomonády se dělí podle stavby buňky na unizoické a diplozoické (viz obr. 1) (Brugerolle & Müller, 2000), přičemž převážná většina druhů je diplozoická.



Obr. 1: Schéma stavby buňky unizoických a diplozoických diplomonád. A: unizoický rod *Enteromonas*; B: diplozoický rod *Hexamita*; C: diplozoický rod *Giardia*. afl – přední bičíky, alfl – anterolaterální bičíky, plfl – posterolaterální bičíky, vfl – ventrální bičíky, cfl – kaudální/cytostomální bičíky, n – jádro, ct – cytostom, ad – adhezivní disk. Podle Brugerolle and Müller, 2000; Silberman et al., 2002.

Mezi unizoickými a diplozoickými diplomonádami jsou značné rozdíly ve stavbě buňky. Buňky unizoických diplomonád mají jedno jádro umístěné v přední části buňky a v základním stavu mají čtyři bičíky (Brugerolle, 1975). Tři jsou pohybové a směřují

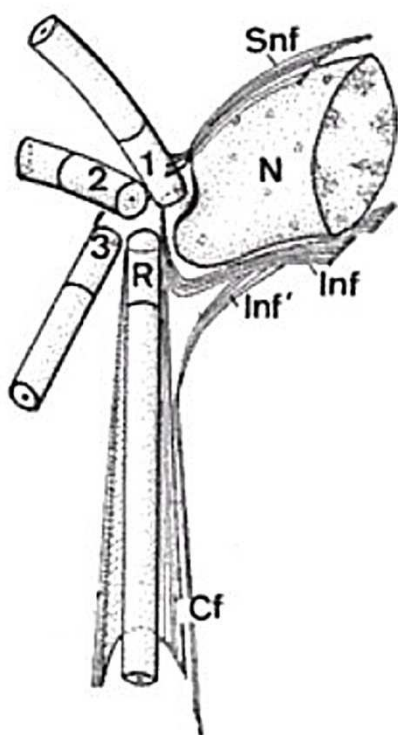
anterolaterálně, jeden je zpětný a pohybuje se v cytostomální rýze, pokud je vyvinuta. Počet bičíků se mezi rody různí. Rod *Enteromonas* má čtyři bazální tělíska a čtyři bičíky, rod *Trimitus* má čtyři bazální tělíska (jedno je holé) a tři bičíky (Brugerolle, 1986) a rod *Caviomonas* má pouze dvě bazální tělíska (jedno je holé) a jeden (zpětný) bičík (Brugerolle & Regnault, 2001). Rody *Enteromonas* a *Trimitus* mají cytostom, u rodu *Caviomonas* cytostom sekundárně zanikl (Brugerolle & Regnault, 2001).

Diplozoické diplomonády mají dvě jádra a dvě sady bičíků (Brugerolle, 1975). Typicky mají čtyři páry bičíků, ale někteří zástupci jich mají méně – rod *Trigonomonas* má tři páry bičíků (Mylnikov, 1985) a rod *Gyromonas* jen dva páry (Seligo, 1886). Také uspořádání bičíků se mezi rody liší. Rod *Hexamita* má tři páry volných, do stran směřujících bičíků a jeden pár procházející skrz cytostomy. Rod *Trepomonas* má jeden pár volných bičíků směřujících do stran a tři páry umístěné v cytostomálních kapsách (Klebs, 1892). Délky bičíků se mohou mezidruhově lišit. Dvě jádra jsou vždy umístěna v přední části buňky a jejich tvar je různý. Například jádra rodu *Hexamita* jsou kulatá a u rodu *Trepomonas* jsou protaženého, až půlměsícového tvaru (Klebs, 1892). U buněk některých diplozoických diplomonád lze nalézt dva trubicovité cytostomy (Brugerolle, 1975), které ústí na zádi buňky a ve kterých se nachází po jednom zpětném bičíku (rody *Hexamita*, *Spironucleus*). Tyto cytostomy mohou být modifikovány na široce otevřené kapsy (rod *Trepomonas*), které mají různý tvar a délku (Klebs, 1892; Mylnikov, 1985), nebo nemusí být vůbec přítomny (rody *Giardia*, *Octomitus*, *Brugerolleia*) (Simpson, 2003). Buňky bez cytostomů se živí pinocytózou (Brugerolle & Müller, 2000). U zástupců rodu *Giardia* se vyvinula unikátní struktura – nepárový přísavný ventrální disk, který slouží k uchycení na střevním epitelu hostitele.

2.1.2. Struktura bičíkového aparátu

Protože se výsledky předložené práce ultrastruktury netýkají, je tato kapitola pojata pouze jako stručný náhled do ultrastruktury řádu Diplomonadida, sloužící především pro utvoření představy o komplikovanosti vnitřní stavby buňky diplozoických diplomonád.

Bazální tělíska diplomonád jsou rozdělena do skupin – kinetid (Simpson, 2003). Unizoické diplomonády mají jednu kinetidu se čtyřmi nebo dvěma bazálními tělíska. Diplozoické diplomonády mají dvě protilehlé kinetidy, každá má čtyři bazální tělíska.



Obr. 2: Postavení bazálních tělísek a průběh mikrotubulárních kořenů. 1 – 3 – bazální tělíska předních bičků, R – bazální tělísko zpětného bičku, N – jádro, Snf – supranukleární mikrotubuly, Inf – infranukleární mikrotubuly, Inf' – protější infranukleární tubuly, Cf – cytosomální mikrotubuly. Podle Brugerolle and Müller, 2000.

S bazálními tělísky jsou asociovány tři mikrotubulární kořeny: supranukleární, infranukleární a cytosomální (Brugerolle & Müller, 2000; Simpson, 2003). Supranukleární mikrotubuly, které jsou orientované anteriorním směrem a podporují cytoplazmatickou membránu, začínají v blízkosti bazálního tělíska 1 (podle obr. 2) (Simpson, 2003). Vedle bazálního tělíska zpětného bičku začíná cytosomální mikrotubulární kořen (též funis nebo přímé vlákno), který směřuje posteriorně a je asociován s cytosomální rýhou nebo trubicí, pokud je přítomna. Infranukleární mikrotubuly (též nepřímé vlákno) rovněž začíná poblíž předního bazálního tělíska 1 (vyjma rodů *Giardia*, *Octomitus*, *Brugerolleia* a *Caviomonas*) (Simpson, 2003) a vede podél spodní strany jader na protilehlou stranu buňky, kde podpírá protější jádro a pak se teprve odděluje a směřuje posteriorně a podpírá cytosom. Zpětný bičík a cytosom jsou prakticky obklopeny asymetrickou žíhanou laminou tvaru U vznikající v oblasti bazálních tělísek (Sterud et al., 1997; Poynton et al., 2004). Ta se

rozšiřuje na zadním konci buňky do srdcovitého tvaru (na příčném řezu). Laminy obou bičků/cytosomů jsou uspořádány do zřetelné biradiální symetrie (Sterud, 1997).

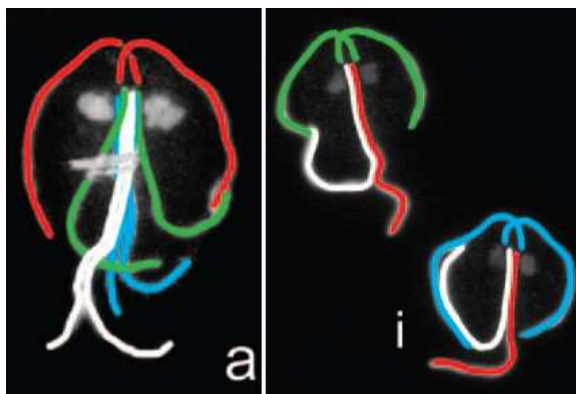
Bazální tělíska unizoických diplomonád jsou rozdělena do dvou párů (Brugerolle, 1975) a jsou situována u ventrální strany jádra. S bazálními tělísky jsou asociované supranukleární mikrotubuly, subnukleární mikrotubuly a dva mikrotubulární kořeny podpírající cytosom.

2.2. Flagelární transformace u parazita *Giardia intestinalis*

Bičíkový aparát diplozoických diplomonád je vzhledem ke své složitosti velmi zajímavým předmětem studia. Podrobně byl prostudován bičíkový aparát druhu *Giardia intestinalis*, a to jak jeho stavba, tak procesy spojené s dělením buňky.

Bičíky druhu *G. intestinalis* se dělí podle své pozice a funkce na anterolaterální, posterolaterální, ventrální a kaudální (Nohýnková et al., 2006).

V každé kinetidě (též tetradě) bičíkového aparátu se nacházejí bazální tělíska od všech čtyř typů bičíků. Podle hypotézy semikonzervativní distribuce by se bičíky měly při dělení buňky pouze rovnoměrně rozdělit mezi dceřiné buňky, které si pak zbylé bičíky samy dosyntetizují (Cleveland, 1963 cit. podle Nohýnková et al., 2006). Takto to ale u giardie neprobíhá – tento mechanismus nevysvětluje, jak je možné, že se bičíky v rámci jedné buňky funkčně i strukturně liší. Až později bylo zjištěno, že bičíky mohou dozrávat a jejich maturace pak trvá déle, než jeden buněčný cyklus (Melkonian, 1991 cit. podle Nohýnková et al., 2006). Bičíky v průběhu tohoto procesu migrují – novější bičíky se přesouvají na místo starších a zaujímají i jejich morfologii a funkci. Tento proces se nazývá flagelární transformace a kromě jiných prvků probíhá také u parazita *Giardia intestinalis*. Ukázalo se ale, že u tohoto prvoka dochází při dělení buňky ke složitějšímu procesu než "pouhému" přesouvání mladších bičíků na pozici starších (Nohýnková et al., 2006). Mezi tetradami totiž dochází při dělení k výměně bazálních tělísek a finální rozdělení bičíků mezi dceřinými buňkami je asymetrické. Pohyb bičíků byl sledován pomocí protilátek a bylo zjištěno, že jedna dceřiná buňka získala oba posterolaterální bičíky, druhá oba ventrální bičíky a každá po jednom anterolaterálním a jednom kaudálním bičíku (viz obr. 3). Poté dochází k transformaci, kdy se posterolaterální a ventrální bičíky přemění na anterolaterální a anterolaterální na kaudální. Nakonec si dceřiné buňky dosyntetizují zbylé bičíky. Nejnovější (nejmladší) jsou tedy dosyntetizované posterolaterální a ventrální



Obr. 3: Bičíkový aparát giardie. a – výchozí stav, i – výsledný stav. Červeně: anterolaterální, zeleně: posterolaterální, modře: ventrální, bíle: kaudální bičíky. Podle Nohýnková et al., 2006.

bičíky, následují starší anterolaterální bičíky a nejstarší jsou bičíky kaudální (Nohýnková et al., 2006).

2.3. Deriváty mitochondrií diplomonád

Všichni zástupci skupiny Diplomonadida jsou anaerobní či mikroaerofilní. V důsledku života v prostředí s nízkými koncentracemi kyslíku byla typická aerobní mitochondrie s kristami v evoluci redukována. Ještě v relativně nedávné minulosti byla Diplomonadida společně s některými dalšími prvky postrádajícími aerobní mitochondrii řazena do říše Archezoa (Cavalier-Smith, 1983). Podle teorie se tyto organismy oddělily od ostatních eukaryot ještě před endosymbiotickou událostí, která vedla k získání mitochondrie. Fylogenetická data teorii podporovala – jednotlivé linie řazené mezi Archezoa se totiž větvyly parafyleticky na bázi eukaryotického stromu (např. Sogin et al., 1989). Později se nicméně bazální postavení příslušných skupin ukázalo být artefaktem přitahování dlouhých větví (Philippe & Germot, 2000; Philippe et al., 2000; Hampl et al., 2009).

Teorie Archezoa byla postupně vyvrácena. V průběhu 90. let 20. století se objevily studie, které poukazovaly na přítomnost genů pro mitochondriální proteiny u různých zástupců archezoí, například u skupin Parabasalia a Microsporidia (Roger et al., 1996; Hirt et al., 1997). Brzy poté byl u domnělých archezoí, konkrétně u druhu *Entamoeba histolytica*, nalezen první redukovaný mitochondriální derivát (Tovar et al., 1999). Ve skutečnosti byly hydrogenosomy u trichomonád známy už o více než dvacet let dříve, tehdy se ale nevědělo, že se jedná o redukovaný derivát mitochondrie (Lindmark & Müller, 1973). Dnes je již jasné, že redukované deriváty mitochondrií má většina skupin řazených do říše Archezoa – pouze u skupiny Preaxostyla je jejich existence dosud sporná (Hampl et al., 2008).

U řádu Diplomonadida se vyskytují dva typy z mitochondrie odvozených organel (MRO – *mitochondrion-related organelles*) – hydrogenosomy a mitosomy. Hydrogenosomy obecně jsou méně redukovanou variantou MRO – jsou větší, účastní se metabolických procesů v buňce a produkují molekulární vodík a ATP (Müller, 1993). Mitosomy jsou redukovanější – jsou menší a nepodílejí se na energetickém metabolismu buňky (Tovar et al., 1999). V souvislosti se ztrátou funkcí a drah spojených s aerobním metabolismem ztratily tyto MRO struktury typické pro mitochondrii – kristy – a také se zmenšila jejich velikost

(méně v případě hydrogenosomu, více v případě mitosomu). Rovněž byl u obou organel částečně nebo zcela redukován genom (Gray, 2012).

V řádu Diplomonadida byla MRO poprvé objevena u vůbec nejvíce studovaného zástupce – střevního parazita *Giardia intestinalis*. Nejprve byla prokázána přítomnost mitochondriálních proteinů (Roger et al., 1998; Tachezy et al., 2001) a poté byla pomocí fluorescenční mikroskopie prokázána jejich lokalizace v mitosomu (Tovar et al., 2003). Později bylo zjištěno, že rovněž rod *Spironucleus* má MRO – poprvé byl derivát mitochondrie objeven u druhu *Spironucleus vortens* (Millet et al., 2013). Nebylo ovšem zřejmé, zda se jedná o hydrogenosom či mitosom. Záhy byla MRO objevena i u druhu *Spironucleus salmonicida* (Jelström-Hultquist et al., 2013) a byla určena jako hydrogenosom.

2.4. Postavení řádu Diplomonadida mezi eukaryoty

Řád Diplomonadida spadá do říše Excavata, konkrétně do skupiny Fornicata. Fornicata pak v rámci exkavát patří mezi Metamonada. Kromě skupiny Metamonada patří mezi Excavata další dvě linie protist: Discoba a *Malawimonas* (Adl et al., 2012). Excavata byla původně charakterizována pouze s použitím morfologických znaků (Simpson & Patterson, 1999). Hlavním znakem této skupiny je přítomnost břišní rýhy, která je podpořena charakteristickým cytoskeletem. V této rýze se nachází cystostom a prochází jí zpětný bičík s ploutvičkami, který pohybem vytváří proud vody přivádějící k cystostomu potravu v podobě bakterií. První taxony, které byly označeny jako exkavátní, mají tyto typické znaky – patří mezi ně rody *Carpodimonas*, *Malawimonas* a *Trimastix* a dále skupiny Jakobida, Diplomonadida, Retortamonadida a Heterolobosea. Existují ale i zástupci, kteří břišní rýhu postrádají a k jejichž zařazení mezi Excavata došlo až díky molekulárně fylogenetickým analýzám (Simpson, 2003).

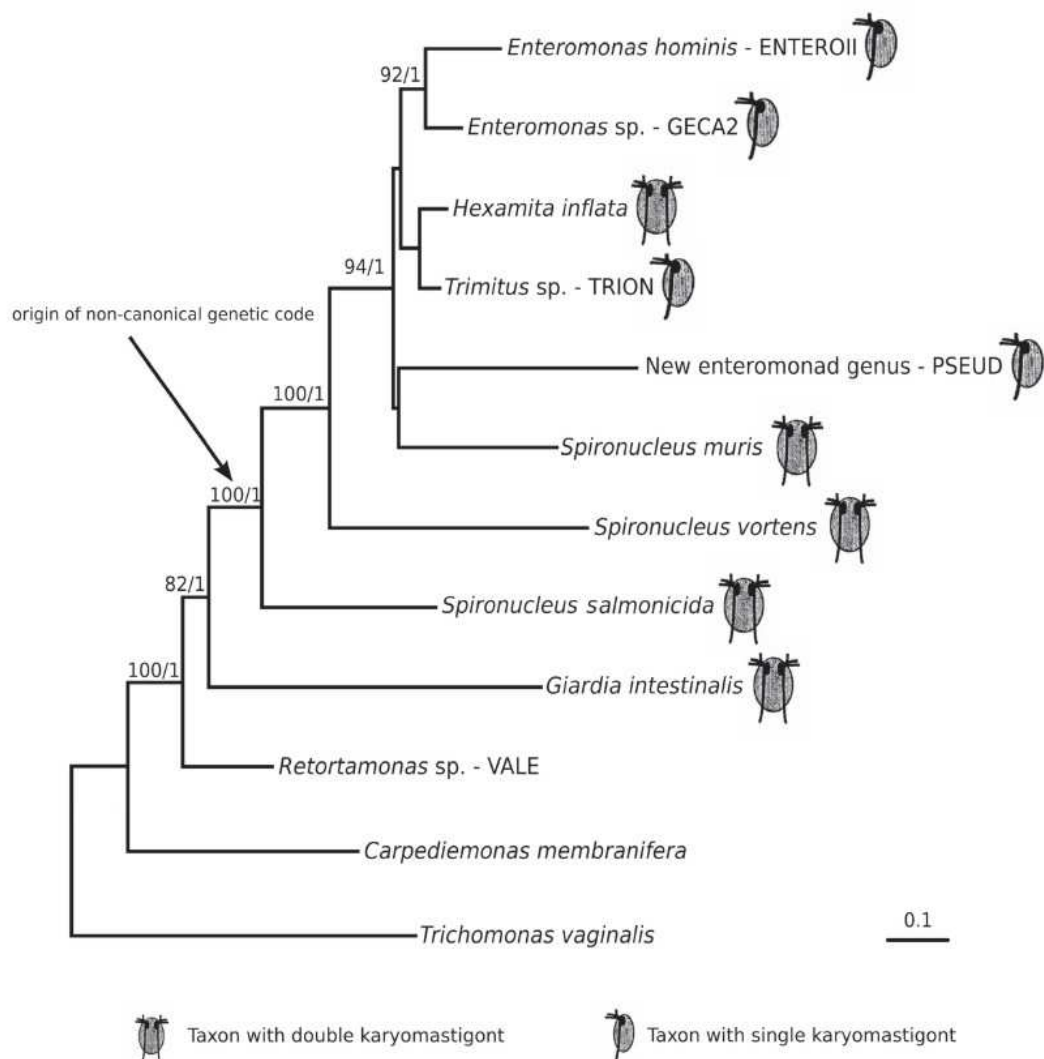
Metamonada jsou kromě fornikát tvořena ještě skupinami Parabasalia a Preaxostyla (Cavalier-Smith, 2003). Všichni zástupci této skupiny jsou anaerobní či mikroaerofilní prvoci, u kterých byla v průběhu evoluce transformována klasická mitochondrie na anaerobní derivát. Metamonada byla vytvořena již v roce 1952, kdy pod tímto názvem Grassé sjednotil většinu zooflagelátů (tj. heterotrofních bičíkovců) se čtyřmi a více bičíky (Grassé, 1952). Toto pojetí zůstalo víceméně zachováno, časem pouze přibyl řád Diplomonadida a skupina

organismů označovaných jako *Carpodomonas-like organisms* (CLOs) (Kolisko et al., 2010). V tomto složení byla Metamonada podpořena molekulárně fylogenetickými studiemi (Hampl et al., 2005). Metamonády byly v evoluci původně čtyřbičíkaté organismy se čtyřmi bazálními tělísky (Cavalier-Smith, 2003), třemi předními a jedním zpětným – tento stav Cavalier-Smith nazývá „pravá tetrakontie“. Dnešní Metamonada mají nicméně bičíků většinou více. Například u diplomonád došlo k duplikaci karyomastigontů, ale výjimkou nejsou ani zástupci s ještě mnohem vyšším počtem bičíků (většinou u skupiny Parabasalia). Naopak karpodimonády jsou dvoubičíkaté, ale na ultrastrukturálních studiích byla pozorována čtyři (Park et al., 2009; Yubuki et al., 2013), tři (Simpson & Patterson, 1999) nebo dvě bazální tělíska (Yubuki et al., 2007).

Fornicata jsou tvořena kromě diplomonád ještě řádem Retortamonadida a již zmíněnými karpodimonádami (Simpson, 2003) (později CLOs). Synapomorfii fornikát je specificky klenutá B-fibrila, jedna z nemikrotubulárních fibril mastigontu (Simpson & Patterson, 2001), která nicméně u diplomonád v evoluci sekundárně zanikla (Simpson, 2003). Monofylie fornikát byla potvrzena ve více fylogenetických analýzách (Kolisko et al., 2008; Kolisko et al., 2010; Takishita et al., 2012). Diplomonadida jsou ovšem jediná Fornicata, která jsou monofyletická – Retortamonadida se ukázala být polyfyletická (Cepicka et al., 2008) a CLOs jsou parafyletické (Takishita et al., 2012). Tato studie také ukázala, že nejbližšími příbuznými řádu Diplomonadida jsou rody *Retortamonas* (Retortamonadida) a *Dysnectes* (CLOs).

2.5. Fylogeneze diplomonád

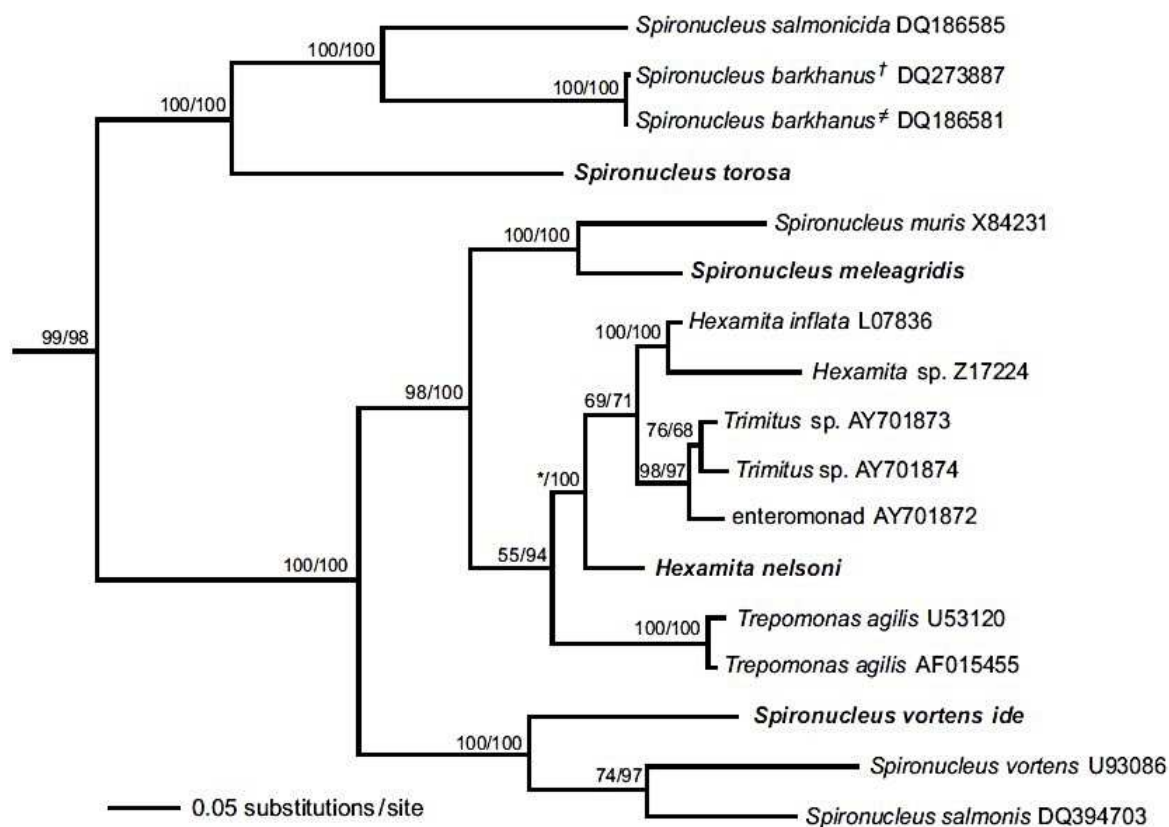
Fylogenetické vztahy uvnitř řádu Diplomonadida nejsou vyřešeny, ačkoliv na toto téma bylo v minulosti publikováno nemálo studií. Na základě analýzy sekvencí genu pro SSU rRNA rodu *Retortamonas* byla dokonce zpochybněna monofylie řádu Diplomonadida (Silberman et al., 2002). V této studii se rod *Retortamonas* větvil jako sesterský rodu *Giardia* a z řádu Diplomonadida se tak stal parafyletický taxon. Statistická podpora této pozice retortamonád byla ovšem velmi nízká. I když se podobné výsledky (rovněž s nízkou podporou) objevily ještě v několika dalších studiích (např. Kolisko et al., 2005), pozdější multigenová analýza nakonec ukázala Diplomonadida jako monofyletickou skupinu (Takishita et al., 2012).



Obr. 4: Fylogenetický strom založený na konkaténátu genů pro SSU rRNA, α -tubulin a HSP90. Hodnoty v uzlech: bootstrap/posteriorní pravděpodobnost. Podle Kolisko et al., 2008.

Diplomonadida byla podle morfologie rozdělena na dvě čeledi: čeleď Enteromonadidae (s rody *Enteromonas*, *Caviomonas* a *Trimitus*), která zahrnuje všechny unizoické diplomonády, a čeleď Hexamitidae, do které spadají diplozoické diplomonády a která byla dále rozdělena do dvou podčeledí. Tyto podčeledi byly rozlišeny podle přítomnosti či nepřítomnosti cytostomů a byly pojmenovány Giardiinae (s rody *Giardia*, *Octomitus* a *Brugeroilleia*; bez cytostomů) a Hexamitinae (s rody *Spironucleus*, *Hexamita*, *Trepomonas*, *Trigonomonas* a *Gyromonas*; s cytostomy) (Kulda & Nohýnková, 1978). Ačkoliv je toto rozdělení logické, fylogenetické analýzy později ukázaly, že není zcela správné. Rozdělení podle cytostomů na Giardiinae a Hexamitinae zůstalo zachováno a bylo potvrzeno fylogenetickými analýzami (např. Kolisko et al., 2005; Jørgensen & Sterud, 2007),

mezi těmito dvěma skupinami je nejstarší větvení fylogenetického stromu diplomonád. Enteromonády se nicméně ukázaly být značně problematickou skupinou. Čeleď Enteromonadidae byla totiž nejdříve na základě 23 morfologických a ultrastrukturálních znaků klasifikována jako parafyletická skupina na bázi fylogenetického stromu diplomonád (Siddall et al., 1992). Z této pozice vyplynulo samozřejmé přesvědčení, že Enteromonadidae se svou unizoickou buňkou předcházejí v evoluci diplozoickým diplomonádám, které vznikly pouze jedenkrát v evoluční historii. První argumenty proti tomuto názoru se objevily ve fylogenetické studii založené na 71 morfologických znacích (Simpson, 2003), která unizoické diplomonády zařadila na bázi skupiny Hexamitinae (také jako parafylum, v tom se obě studie shodují). Do problému nakonec vnesla světlo první molekulárně-fylogenetická studie zahrnující unizoické diplomonády rodu *Trimitus*, která byla provedena na genu pro SSU rRNA (Kolisko et al., 2005). Ta teorii vzniku diplozoických diplomonád z unizoických jedenkrát v evoluční historii zpochybnila. Ukázalo se, že unizoické diplomonády nespočívají na bázi fylogenetického stromu, ale řadí se dovnitř skupiny Hexamitinae (Kolisko et al., 2005), konkrétně do blízkosti volně žijících rodů *Trepomonas* a *Hexamita*. Pozice unizoických diplomonád uvnitř Hexamitinae byla velmi dobře podpořena a byla posléze potvrzena díky studii založené na třech genech (viz obr. 4), která navíc souhlasila se studiemi předcházejícími té z roku 2005 v tom, že unizoické diplomonády nejsou monofyletická skupina (Kolisko et al., 2008). Kromě rodů *Trimitus* a *Enteromonas* byly do této studie přidány další – dosud nepopsané – izoláty unizoických diplomonád označené PSEUD a PYX, které tvoří samostatnou linii. Na fylogenetickém stromě si tyto tři skupiny unizoických diplomonád nebyly blízcě příbuzné – větvil se nezávisle v rámci skupiny Hexamitinae (viz obr. 4). V rámci skupiny Hexamitinae netvoří monofylum ani endobiotický rod *Spironucleus*, který je parafyletický. Fylogenetická analýza genu pro SSU rRNA rozdělila tento rod na tři větve, které se mohly vyvinout odděleně v hostitelích v moři, ve sladkých vodách a na souši (Jørgensen & Sterud, 2007). S vysokou statistickou podporou se vytvořila oddělená větev rodu *Spironucleus* sesterská všem ostatním Hexamitinae. Do této větve spadají druhy *S. salmonicida*, *S. barkhanus* a *S. torosa*. Druhou oddělenou skupinu vytvořily druhy *S. vortens* a *S. salmonis*. Do třetí skupiny pak patří rody *S. muris* a *S. meleagridis* (viz obr. 5). Tato skupina se měla v každé ze dvou analýz této studie jinou pozici. Vyšší



Obr. 5: Fylogenetický strom vytvořený metodou maximální parsimonie (MP) a minimální evoluce (ME). Založen na genu pro SSU rRNA. Hodnoty v uzlech: bootstrap MP/bootstrap ME. Podle Jørgensen & Sterud, 2007.

statistickou podporu měla pozice sesterská větví tvořené rody *Trepomonas* a *Hexamita* a unizoickými diplomonádami.

Skupina Giardiinae je tvořena třemi endobiotickými rody. Největší a nejznámější je rod *Giardia*. Druhým rodem je *Octomitus* a třetí rod *Brugeroelleia* je tvořen jediným druhem *B. algonquinensis*. *Octomitus* sdílí společné znaky jak s rodem *Giardia* (chybějící cytostomy, holé axonemy zpětných bičíků v cytoplazmě), tak s rodem *Spironucleus* (pozice bazálních tělísek), který náleží do skupiny Hexamitinae. Celkově je ale *Octomitus* mnohem méně odvozený než *Giardia* (Keeling & Brugeroelle, 2006). Studie Keeling & Brugeroelle, 2006 byla prvním důkazem založeným na molekulárních datech, že *Octomitus* je blízce příbuzný rodu *Giardia* a že skupina Giardiinae je monofyletická. Z rodu *Brugeroelleia* zatím nejsou molekulární data, ale je považována za blízce příbuznou rodu *Octomitus* (Desser et al., 1993).

2.6. Evoluce stavby buňky

Jak již bylo řečeno, teorie vývoje diplozoických diplomonád z unizoických jedenkrát v evoluční historii byla zpochybněna fylogenetickými analýzami. Jaká je tedy současná představa o evoluci stavby buňky?

Nabízejí se dvě odlišné varianty průběhu evoluce stavby buňky diplomonád. V první z nich se diplozoické diplomonády vyvinuly z unizoického předka mnohokrát nezávisle na sobě (pětkrát až sedmkrát) (Kolisko et al., 2008). Jako mechanismus přeměny buňky byla navržena heterochronie (Siddall et al., 1992; v této studii nicméně ještě byly unizoické diplomonády považovány za bazální), tedy desynchronizace relativního načasování karyokineze a cytokineze vůči sobě. V tomto případě by se jednalo o karyokinezi bez cytokineze. Heterochronie ale může být mechanismem přeměny buňky i v druhé variantě evoluce, kdy by unizoické diplomonády vznikly reduktivním vývojem z diplozoických zástupců (nejméně třikrát). Zde by se ale jednalo naopak o cytokinezi bez karyokineze (Kolisko et al., 2008). Pro vznik unizoického prvka z diplozoického ovšem kromě heterochronie existuje ještě druhý mechanismus přeměny. Je jím splnutí jader v diplozoické buňce, přičemž zaniká jeden karyomastigont (Kolisko et al., 2008).

Bude třeba dalších studií, aby bylo možné objasnit, jak evoluce morfologie buňky u diplomonád probíhala. Vzhledem ke zdvojené stavbě buňky je nepochybné, že propojení karyomastigontů a bičíkový cyklus při dělení buňky jsou komplikované. Studie procesu dělení buňky a s ním spojenými pohyby bičíků na druhu *Giardia intestinalis* to ostatně dokazuje (Nohýnková et al., 2006). Obě navržené varianty evoluce stavby buňky se proto jeví jako značně problematické. Nutno ale podotknout, že zmíněná studie na giardii je zatím jediná na toto téma u řádu Diplomonadida a její výsledky proto nelze zobecnit na celý řád.

2.7. Evoluce způsobu života

Diplomonadida mají jak volně žijící, tak endobiotické (komenzální i parazitické) zástupce. Je tedy nasnadě otázka, jak v této skupině probíhala evoluce způsobu života.

Vzhledem ke značnému množství adaptací, které endobiotický způsob života buňce nutně přináší, se zdá jako nejpřirozenější postup vývoje od volně žijícího prvka

k endobiotickému (Siddall et al., 1993). Už fylogenetické studie založené na morfologických znacích provedené před nástupem molekulární fylogenetiky – jakkoliv si v jiných ohledech odporovaly – se shodly na tom, že na bazální pozici stromu diplomonád patří endobiotické rody (Siddall et al., 1992; Simspon, 2003). Molekulární data později potvrdila, že tomu tak skutečně je (Kolisko et al., 2005; Kolisko et al., 2008), i když na bázi zařadila jiné skupiny. Z těchto posledních analýz je zřejmé, že u diplomonád existují sekundárně volně žijící linie. Jsou to rody *Hexamita*, *Trepomonas*, a dokonce byly nalezeny volně žijící unizoické diplomonády – konkrétně rodu *Trimitus* (Kolisko et al., 2008). Budou ovšem potřeba další fylogenetické a morfologické studie, aby bylo možno proces návratu z vnitřního prostředí do vnějšího objasnit.

2.8. Taxonomie řádu Diplomonadida

Diplozoické diplomonády byly poprvé sjednoceny do společného taxonu již na konci 19. století (Klebs, 1892) a byly pojmenovány Distomata. Až později byl zaveden název Diplomonadida (Wenyon, 1926). V počátcích byly zařazeny do této skupiny následující, převážně volně žijící rody: *Trigonomonas*, *Hexamitus*, *Trepomonas* a *Urophagus* (Klebs, 1892). Poslední ze jmenovaných rodů byl ale už v první polovině 20. století odmítán (viz níže) a postupem času byly mezi Diplomonadida zařazeny další rody: *Gyromonas*, *Lambliia*, *Giardia*, *Octomitus*, *Spironucleus*, *Brugeroelleia* a unizoické rody *Enteromonas*, *Trimitus* a *Caviomonas*.

Rod *Lambliia* v současné době není používán, všechny jeho druhy byly přearženy do rodu *Giardia*. Jako první byl popsán rod *Giardia* – poprvé tento název pro rod použil Kunstler v roce 1882, když nazval prvoka (nalezeného v pulci) *Giardia agilis* (Adam, 2001). V roce 1888 nicméně Blanchard vytvořil rod *Lambliia* pro prvoka *Lambliia intestinalis* napadajícího člověka. Odborníci se však přiklonili k tomu, že druhy *Giardia agilis* a *Lambliia intestinalis* by měly patřit do jednoho rodu, přičemž prorit má rodové jméno *Giardia*. Proto Stiles (1902) přearžoval druhy rodu *Lambliia* do rodu *Giardia* (Adam, 2001).

Níže je uveden taxonomický přehled do úrovně rodu. Ke každému rodu je připojen stručný popis, typový druh a seznam dalších druhů. Při popisu byl kladen důraz zejména na volně žijící zástupce, kterými se tato práce zabývá. Uvedený taxonomický systém je podle studie Kulda a Nohýnková, 1978.

Řád: Diplomonadida Wenyon, 1926

Čeleď: Hexamitidae Kent, 1880

Podčeleď: Hexamitinae Kulda a Nohýnková, 1978

Do této skupiny patří většina volně žijících zástupců řádu Diplomonadida, jsou zde ale i rody čistě (*Spironucleus*) nebo částečně endobiotické (*Hexamita*, *Trigonomonas*). Určujícím znakem této podčeledi je přítomnost dvou cytostomů (Kulda a Nohýnková, 1978).

Trepomonas Dujardin, 1841

Všichni zástupci tohoto rodu jsou volně žijící. Buňky mají vejčitý až kuželovitý tvar, jsou zploštělé a na obou koncích zaoblené (Klebs, 1892). Délka buněk se pohybuje v rozmezí 7 – 30 μm (Klebs, 1892; Mylnikov, 1985). Po stranách buněk se nacházejí dvě protilehlé kapsy sloužící k příjmu potravy. Tvar a délka těchto kapes jsou druhově specifické. Průřez těla je většinou esovitý. Trepomonády mají čtyři páry bičíků, vybíhající od horního konce postranních kapes – buď je jeden pár dlouhý a tři kratší, nebo dva páry dlouhé a dva kratší (Mylnikov, 1985). Kratší bičíky jsou uloženy v kapsách. Buňky při pohybu směřují vpřed se silnější či slabší rotací (Klebs, 1892). Pohyb je důležitým znakem při určování druhů tohoto rodu.

Typový druh: *Trepomonas agilis* Dujardin, 1841. Klebs (1892) rozlišil podle velikosti tři variety tohoto druhu: *T. agilis* var. *simplex*, *T. agilis* var. *communis* a *T. agilis* var. *angulatus*. Velikostí odpovídá originálnímu popisu z roku 1841 varieta *communis*. Časem byly tyto variety uznány jako samostatné druhy (Mylnikov, 1985) a název *Trepomonas agilis* samotný byl odsunut do pozadí. V současné době je název *Trepomonas agilis* používán, druh *T. communis* je považován za synonymum (Bernard et al., 2000). Na základě měření i varieta *simplex* považována za synonymum *T. agilis* (Bernard et al., 2000). Pro odlišení či synonymizaci variety *angulatus* bude potřeba více morfologických dat.

Další druhy: *Trepomonas steinii* Klebs, 1892; *Trepomonas rotans* Klebs, 1892; *Trepomonas latecapitata* Skuja, 1956.

Hexamita Dujardin, 1841

Jedná se o rod s volně žijícími i endobiotickými zástupci. Buňky jsou oválné až podlouhlé, málo zploštělé a přední konec je zaoblený (Klebs, 1892). Jsou 10 – 35 μm dlouhé (Mylnikov, 1985). Po stranách buněk jsou přítomny dva trubicovité cytostomy. Dujardin popsal u tohoto druhu pouze šest bičíků: dva páry směřující vpřed a jeden pár vzad (Dujardin, 1841). Ve skutečnosti má tento rod bičíků osm (Klebs, 1892). Na předním konci se nachází tři páry bičíků uspořádané do dvou skupin, v každém z protilehlých cytostomů pak leží jeden zpětný bičík. Buňky se pohybují rychle přímo vpřed a lehce přitom rotují. Na rozdíl od rodu *Trepomonas* nelze způsob pohybu použít jako determinační znak.

Typový druh: *Hexamita inflata* Dujardin, 1838.

Další druhy: Volně žijící (podle Lee, 2006): *Hexamita angusta* Klebs, 1892; *Hexamita caudata* Skuja, 1939; *Hexamita crassa* Klebs, 1892; *Hexamita eurykephale* Skuja, 1956; *Hexamita fissa* Klebs, 1892; *Hexamita furcata* Zhukov, Mylnikov & Moiseev, 1976; *Hexamita fusiformis* Klebs, 1892; *Hexamita gyrans* Stokes, 1887; *Hexamita mutabilis* Zhukov et al. 1978; *Hexamita minor* (Tschernov, 1950), Mylnikov 1985; *Hexamita pusilla* Klebs, 1892; *Hexamita rostrata* Stein, 1878; *Hexamita tremellorani* Skuja, 1939; *Hexamita truncata* Stokes, 1888. Endobiotické: např. *Hexamita nelsoni* Schlicht & Mackin, 1968.

Urophagus Klebs, 1892

Vejčité podlouhlé tělo, podobné rodu *Hexamita* (Klebs, 1892; Kudo, 1931). Buňky jsou dlouhé 16 – 25 μm a mají osm bičíků - tři páry vpředu, jeden v rýhách po stranách (Klebs, 1892). Rod *Urophagus* se odlišuje od rodu *Hexamita* přítomností pouze jednoho cytostomu na zadním konci buňky, kde jsou dva malé výrůstky (Klebs, 1892). Díky této odlišnosti byl zaveden samostatný rod pro jediný druh. Tento rod byl nicméně přijímán skepticky (Wenyon, 1926) – ohledně pozice cytostomu (a navíc jediného) vládly značné pochybnosti. Postupně přibývalo do rodu několik dalších druhů (viz níže), ale nakonec rodové jméno přestalo být uznáváno a všechny druhy byly přearány do rodu *Hexamita* (Mylnikov, 1985).

Typový druh: *Urophagus rostratus* (Stein, 1878) Klebs, 1892. Původně *Hexamita rostrata*.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *Urophagus minor* Tschernov, 1950, *Urophagus caudatus* Skuja, 1939. Oba druhy jsou dnes řazeny do rodu *Hexamita*.

Spironucleus Lavier, 1936

Obligátně endobiotičtí prvoci, napadají široké spektrum obratlovců, zejména však ryby. Vzhledově jsou podobní rodu *Hexamita*, odlišují se tvarem jader, pozicí bazálních tělísek vzhledem k jádrům, pozicí zpětného bičíku vzhledem k jádrům a dalšími znaky (viz Poynton et al., 2004). Do tohoto rodu byl na základě ultrastrukturální studie přerazen častý parazit ryb *Hexamita salmonis*, který byl synonymizován s druhem *Octomitus salmonis* a přejmenován na *Spironucleus salmonis* (Poynton et al., 2004).

Typový druh: *Spironucleus elegans* Lavier, 1936.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *S. barkhanus* Sterud, Mo & Poppe, 1997; *S. salmonicida* Jørgensen & Sterud, 2006; *S. torosa* Poynton & Morisson, 1990; *S. vortens* Poynton et al., 1995. (Sterud, Mo & Poppe, 1997; Jørgensen & Sterud, 2006; Poynton & Morrison, 1990; Poynton et al., 1995).

Gyromonas Seligo, 1886

Jedná se o volně žijící prvoky. Buňky jsou zploštělé a lehce spirálně zatočené (Seligo, 1886). Délka se pohybuje v rozmezí 6 – 10 µm. Mají čtyři bičíky rozdělené do dvou párů vycházející ze zaoblených předních rohů buňky. Cytostomy nebyly pozorovány (Kudo, 1931).

Typový druh: *Gyromonas ambulans* Seligo, 1886.

Další druhy: *Gyromonas salinus* Ruinen, 1938.

Trigonomonas Klebs, 1892

Tento rod obsahuje volně žijící i endobiotické zástupce. Buňky jsou trojúhelníkovité, vpředu široké a zaoblené, vzadu zašpičatělé, celé silně zploštělé (Klebs, 1892). Tvar těla může být proměnlivý, ale vrací se do trojúhelníkové formy. Délka je 24 – 33 µm (Klebs, 1892).

U každého ze dvou předních rohů buňky se nachází tři bičíky různých délek. Nejdelší bičík je dlouhý jako buňka, nejkratší je asi poloviční. Žádný bičík nesměřuje přímo dozadu. Buňky mají dva podlouhlé cytostomy (Mylnikov, 1985). Při pohybu rotuje kolem podélné osy těla.

Typový druh: *Trigonomonas compressa* Klebs, 1892.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *T. diplostomum* Marx, 1927; *T. inflata* Skuja, 1956; *T. intermittens* Skuja, 1956.

Podčeleď: *Giardiinae* Kulda & Nohýnková, 1978

Všichni zástupci této skupiny jsou endobiotičtí, nezdědka parazitičtí prvoci. Tato podčeleď byla odlišena na základě nepřítomnosti cytostomů (Kulda a Nohýnková, 1978), buňky se živí pinocytózou.

Giardia Kunstler, 1882

Obligátně endobiotičtí prvoci. I patogenní druhy, napadají obratlovce (Wenyon, 1926). Poprvé tento druh spatřil Antony van Leeuwenhoek již v roce 1681. Apomorfii rodu je přísavný disk na ventrální straně buňky.

Typový druh: *Giardia agilis* Kunstler, 1882

Na základě morfologie a fylogenetických analýz byl rod *Giardia* rozdělen na čtyři druhové skupiny: *Giardia agilis*, *G. intestinalis*, *G. microti* a *G. muris* (Kulda & Nohýnková, 1978; Feely, 1988 cit. podle Monis et al., 1999; Filice, 1952 cit. podle Monis et al., 1999).

Octomitus Prowazek, 1904

Rod vnějším vzhledem podobný rodu *Hexamita*. Buňky ale nemají cytostomy. Zástupci tohoto rodu jsou endobiotičtí (Kudo, 1931).

Typový druh: *Octomitus intestinalis* Prowazek, 1904.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *Octomitus dujardinii* Dobell, 1909; *Octomitus elongatus* Marques da Cunha & Muniz, 1925.

Brugerolleia Dessler, Hong, Siddall & Barta, 1993

Endobiotický prvok nalezený v krvi žab (Dessler et al., 1993). Buňka má čtyři páry bičíků vycházejících z přední části buňky. Jeden pár bičíků je zpětný, každý ze zpětných bičíků je asociovaný s trychtýřovitou strukturou.

Typový druh: *Brugerolleia algonquinensis* Dessler, Hong, Siddall & Barta, 1993. Jediný druh tohoto rodu.

Čeleď: Enteromonadidae Brugerolle, 1975

Brugerolle v roce 1975 popsal podčeleď unizoických diplomonád a nazval ji Enteromonadina. Tato podčeleď byla později povýšena na čeleď Enteromonadidae (Kulda & Nohýnková, 1978).

Enteromonas da Fonseca, 1915

Jedná se o obligátně endobiotické prvoky, žijící ve střevě obratlovců. Buňky mají čtyři bičíky – tři se pohybují volně anterolaterálním směrem a jeden je uložený ve ventrální rýze a směřuje vzad (Brugerolle, 1975).

Typový druh: *Enteromonas hominis* da Fonseca, 1915.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *Enteromonas caviae* Lynch, 1922; *Enteromonas fonsecai* Yakimov, 1923; *Enteromonas lagostomi* Cunha & Muniz, 1927.

Trimitus Alexeieff, 1911

Tento rod má endobiotické i volně žijící zástupce (Kolisko et al., 2005). Buňka má pouze tři bičíky.

Typový druh: *Trimitus motellae* Alexeieff, 1911.

Další druhy (pouze vybrané příklady): *Trimitus trionici* Knowles & Gupta, 1930; *Trimitus parvus* Grassé, 1932.

Caviomonas Nie, 1950

Endobiotický rod. Buňka má pouze jeden bičík a jedno holé bazální tělísko (Brugerolle & Regnault, 2001). Cytostom chybí.

Typový druh: *Caviomonas mobilis* Nie, 1950.

Další druhy: *Caviomonas frugivori* Navarathnam, 1970.

3. Metodika

3.1. Sběr vzorků

Vzorky pro kultivaci byly sbírány převážně na sladkovodních stanovištích, pouze v ojedinělých případech se jednalo o vody brakické. Ve vzorcích mořských sedimentů Diplomonadida nebyla pozorována. Do 15ml nebo 50ml polypropylenových zkumavek byl odebírán anoxický sediment bohatý na organickou složku tak, aby ve zkumavce zbylo minimum vzduchu. Poměr sedimentu a vody ve zkumavce se obvykle pohyboval kolem 1:1. Kultury pak byly vždy nejpozději do čtyř týdnů přepraveny do laboratoře a kultivovány.

3.2. Kultivace

Ze sebraných vzorků bylo odebráno přibližně 1 – 2 ml sedimentu, které byly inokulovány do 9 ml ATCC 802 média, 3% LB média nebo do 10 ml brakického média. První pasážování nové kultury bylo provedeno po 14 dnech, následující pak vždy po 7 dnech. Ze dna zkumavky byl odebrán cca 1 ml sedimentu, který byl inokulován do čistého média. Pokud bylo sedimentu více než 1 ml, byl přenesen do nové zkumavky všechen. Pokud nebyl vzorek po deseti pasážích pozitivní na diplomonády, kultivace byla ukončena. Kultivace probíhala v temnu při pokojové teplotě.

3.2.1. Složení a příprava kultivačních médií

Všechna média byla před použitím sterilizována v autoklávu (20 minut při 121 °C) a posléze skladována v lednici při 4 °C. Před použitím byla sterilně rozplněna do 15ml kónických polypropylenových zkumavek po 9 ml (ATCC 802 a 3% LB) nebo 10 ml (ATCC 1525 a brakické médium).

Sonnebornovo parameciové médium (ATCC 802)

Složení: • Cereal Grass Media (Scholar Chemistry, USA; Ward's science, USA)

- Na_2HPO_4
- destilovaná voda

Příprava: Do 1000 ml destilované vody bylo vsypáno 2,5 g Cereal Grass Media a směs byla přivedena k varu. Po 5 minutách vaření byla směs odstavena a po ochlazení filtrována přes filtrační papír. Roztok byl nakonec doplněn destilovanou vodou do 1000 ml celkového objemu a bylo do něj přidáno 0,5 g Na_2HPO_4 .

Umělá mořská voda (ASW)

Složení: • NaCl

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- KCl
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- NaHCO_3
- destilovaná voda

Příprava: Aby se předešlo vysrážení solí, byla umělá mořská voda připravována ve třech oddělených roztocích. Roztok A byl připravován z 24,72 g NaCl, 4,66 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,36 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 0,68 g KCl, do 300 ml destilované vody. Roztok B byl připravován z 6,29 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, do 100 ml destilované vody. Roztok C byl připravován z 0,18 g NaHCO_3 , do 100 ml destilované vody.

Mořské Sonnebornovo parameciové médium (ATCC 1525)

Složení: • NaCl

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- KCl
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- NaHCO_3
- Cereal Grass Media (Scholar Chemistry, USA)
- destilovaná voda

Příprava: Sterilně bylo smícháno 0,5 l umělé mořské vody (ASW) a 0,5 l 2x koncentrovaného ATCC 802 média bez přidaného Na_2HPO_4 .

Brakické 802 médium

Složení a příprava: Brakické médium je směsí médií ATCC 802 a ATCC 1525 v poměru 1:1.

3% Luria-Bretani médium (3% LB)

Složení: • LB broth (Sigma-Aldrich, USA)

- destilovaná voda.

Příprava: 0,6 g LB broth bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody.

3.3. Světelná mikroskopie

3.3.1. Nativní preparáty

Diplomonadida byla pozorována *in vivo* v kapce média na podložním skle, překryté krycím sklíčkem. K pozorování byl použit mikroskop vybavený fázovým kontrastem – mikroskop Zeiss (Německo) – nebo Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem – mikroskop Olympus BX51TF (Japonsko).

Vzhledem k vysoké pohyblivosti buněk bylo vyzkoušeno několik metod na zpomalení až zastavení buněk. První z těchto metod představovalo potření krycího skla poly-L-lysinem. Po zaschnutí bylo krycí sklíčko přiloženo na kapku média na podložním skle a vzorek byl ihned pozorován.

Druhou metodou zpomalení buněk bylo použití roztoku methylcelulosity. Na podložní sklíčko byla nanесena kapka 2% roztoku methylcelulosity, která byla pomocí krycího sklíčka rozetřena do tenkého filmu. Na tento film pak byla nanесena kapka média a vše bylo překryto čistým krycím sklíčkem.

Třetí vyzkoušenou metodou znehybnění nebo alespoň zpomalení buněk bylo použití formaldehydu, který byl v malém množství přidán do vzorku na skle.

3.3.2. Barvení protargolem dle Bodiany, modifikováno dle Nie (1950) a Ptáčková (2010)

Při barvení protargolem se provádí fixace za vlhka. Díky tomuto postupu se zachová prostorové rozložení buněk a je možno sledovat jednotlivé orgány a jejich vzájemné umístění. V průběhu procesu barvení je proto nezbytné dávat pozor na to, aby preparáty nikdy nevyschly. Tato metoda barvení je relativně náročná a její výsledky nejsou vždy

uspokojivé. Abychom tedy získali kvalitní preparáty, je nutné, aby byl každý izolát barven na více sklíčkách (zpravidla 2 – 5).

1. den: Příprava materiálu, fixace

- Příprava Bouin-Hollandovy fixáže: V 800 ml destilované vody bylo rozpuštěno 25 g octanu měďnatého. Ve vzniklém roztoku bylo dále rozpuštěno 40 g kyseliny pikrové a následně bylo přidáno 100 ml 40% roztoku formaldehydu. Poté bylo vše doplněno destilovanou vodou do celkového objemu 1000 ml. Před procesem fixace byla fixáž rozplněna po 30 ml do Petriho misek, kam bylo posléze přidáno 1,5 ml ledové kyseliny octové.
- Pro lepší manipulaci se sklíčky byly připraveny přibližně 2 cm dlouhé polypropylenové pásky, do kterých byl udělán skalpelem zářez do poloviny délky, sloužící k nasunutí sklíčka. Na druhém konci byla každá páska označena zářezy pro snazší orientaci v izolátech.
- Aby buňky lépe přilnuly ke sklíčku, byl připraven roztok sterilně odebraného bílku a příslušného média v poměru 1:4.
- Fixace: Z narostlé kultury bylo odebráno 1 – 1,5 ml vzorku do 1,5ml mikrozkuřavky. Vzorek byl následně centrifugován po dobu 10 minut na 1200 g. Poté byla odebrána většina supernatantu a buněčný pelet byl resuspendován. Na krycí sklo 15x15 cm byl nanesen 1 μ l buněčné suspenze a do jeho blízkosti 1 μ l roztoku bílku. Kapky byly pomocí špičky spojeny a následně rozetřeny po povrchu sklíčka. Sklíčko pak bylo ihned vhozeno natřenou stranu dolů do Petriho misek s Bouin-Hollandovou fixází tak, aby plavalo na hladině. Po několika minutách bylo sklíčko šetrně obráceno natřenou stranou vzhůru a ponořeno do fixáže. Vzorky se takto fixovaly 20 minut – 14 hodin. Po dokončení fixace byla sklíčka upevněna na připravené polyethylenové pásky a opláchnuta jedenkrát v 50% ethanolu a třikrát v 70% ethanolu. V 70% ethanolu byly vzorky uchovány přes noc.

2. den: První fáze barvení

- 1% roztok protargolu je nezbytné míchat vždy těsně před použitím. Navážený protargol byl nasypán na hladinu destilované vody v kádince, kde se nechal

rozpustit. Zároveň byly připraveny kádinky, na jejichž dno byl položen stočený měděný drát.

- Ze 70% ethanolu byly preparáty převedeny přes 50% ethanol do destilované vody.
- Preparáty byly vloženy na 5 minut do 0,5% roztoku KMnO_4 .
- Posléze byly preparáty opláchnuty v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- Sklíčka byla vložena na 5 minut do 5% roztoku kyseliny oxalové.
- Pak byly preparáty opět opláchnuty v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- Do kádinek s měděným drátem na dně byl přelit rozpuštěný protargol a do něj byla následně do vertikální polohy naskládána sklíčka s preparáty. Mezi sklíčka byly vloženy další kousky měděného drátku.
- Kádinka byla dobře uzavřena fólií a umístěna do 37 °C na 48 hodin.

4. den: Druhá fáze barvení a kompletace preparátů

- Preparáty byly opláchnuty v destilované vodě, 2x po 5 sekundách.
- Sklíčka byla posléze přesunuta na 10 minut do redukčního roztoku (vodného roztoku 1% hydrochinonu a 5% Na_2SO_3).
- Preparáty byly opět opláchnuty v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- Preparáty poté byly plastovou pinzetou vloženy na 5 minut do 0,5% – 1% roztoku AuCl_3 .
- Sklíčka byla z roztoku AuCl_3 vyňata plastovou pinzetou a opláchnuta, 2x po 5 sekundách.
- Poté byla sklíčka ponořena na 5 minut do 2% roztoku kyseliny oxalové.
- Preparáty byly opláchnuty v destilované vodě, 5x po 30 sekundách.
- Preparáty byly ponořeny na 10 minut do 5% roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
- Sklíčka pak byla proplachována po dobu 20 minut pod tekoucí vodou z vodovodu.
- Preparáty byly následně převedeny alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96%, 100%) a 3x xylenem.
- Sklíčka s preparáty byla poté montována na podložní skla do kapky *DPX Mountant for histology* (Sigma-Aldrich, USA).
- Preparáty následně tuhly nejméně 48 hodin v horizontální poloze. Posléze bylo možno je pozorovat.

3.3.3. Fotodokumentace a měření buněk

Nativní preparáty byly pozorovány a fotografovány na mikroskopu Olympus BX51TF vybaveném Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem a digitálním fotoaparátem Olympus DP71(Olympus, Japonsko). Protargolem barvené preparáty byly pozorovány na téže mikroskopu, bez Nomarského DIC a v normálním světle s modrým filtrem. Pro ovládání fotoaparátu byl použit program Quick Photo Micro 2.3. Vybrané fotografie pak byly upravovány v programu Corel Photo Paint.

V programu Quick Photo Micro 2.3 byly vyfotografované buňky z nativních i protargolových preparátů také měřeny. Od každého izolátu bylo vždy měřeno 30 buněk, jak v případě nativních, tak i barvených preparátů. Měřena byla délka buňky bez bičíků a šířka v nejširším místě buňky – zpravidla to bylo v oblasti horní části kapes s bičíky. Délka bičíků nebyla měřena kvůli jejich trvalé špatné vizualizaci na fotografiích. Ke zpracování naměřených dat byl použit program R 2.12.0, s jehož pomocí bylo vypočítáno rozpětí hodnot, aritmetických průměr a směrodatná odchylka.

3.4. Molekulárně biologické techniky

3.4.1. Izolace DNA

Z narostlé kultury bylo odebráno 1 – 1,5 ml vzorku do 1,5ml mikrozkušavky. Vzorek byl následně centrifugován po dobu 10 minut na 1200 g, aby došlo k zahuštění buněk. Po stočení na centrifuze byl z mikrozkušavky odebrán supernatant tak, aby zbylo přibližně 200 µl média, ve kterém byl resuspendován pelet. Izolace posléze pokračovala podle protokolu z izolačního kitu. K izolaci byly používány tyto kity a protokoly:

- DNeasy Blood®& Tissue Kit (Qiagen, GER), protokol "Purification of total DNA from animal blood or cells, spin – column protocol"
- ZR Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research, USA), protokol "Cell suspension and proteinase K digested samples"
- Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) (Geneaid Biotech Ltd., TWN), protokol "Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) Protocol"

Izolovaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

3.4.2. Amplifikace, elektroforéza a purifikace

Cílové fragmenty SSU rDNA byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím univerzálních eukaryotických a specifických primerů. Nejčastěji byla používána kombinace eukaryotického primeru Medlin B a specifického primeru 355F. Pro přehled všech primerů úspěšně používaných pro amplifikaci viz tab. 1. Chemikálie používané při PCR byly zakoupeny od firem Top Bio (ČR) a Fermentas (UK). Složení reakčních směsí pro PCR je znázorněno v tab. 2 (pro LA polymerázu) a v tab. 4 (pro Taq polymerázu). Výsledný objem reakční směsi byl buď 25 μ l, nebo 50 μ l, přičemž koncentrace chemikálií byla vždy stejná. Vlastní reakce vždy probíhala v termocykléru T100™ Thermal Cycler (Biorad, ČR). Pro nastavení termocykléru pro LA polymerázu respektive Taq polymerázu viz tab. 3 respektive tab. 5

Tab. 1: Přehled primerů používaných při amplifikaci DNA

| Primer | Citace | Sekvence 5' - 3' |
|--------------|---------------------|--------------------------|
| Medlin A (F) | Medlin et al. 1988 | AYCTGGTTGAYYTGCCAG |
| Medlin B (R) | Medlin et al. 1988 | TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC |
| 355F | Kolísko, unpubl. | GAGAGACGGYTCAYA |
| 706R | Kolísko, unpubl. | ATCATCCTATTTCACCYDTCC |
| EK 42F | Marande et al. 2009 | CTCAARGAYTAAGCCATGCA |
| EK 1498R | Marande et al. 2009 | CACCTACGGAAACCTTGTTA |

Tab. 2: Složení reakční směsi pro LA polymerázu

| Chemikálie | Objem |
|--|---------------|
| LA pufr | 5 μ l |
| LA dNTP | 1,5 μ l |
| 355F (10 pmol. μ l ⁻¹) | 2,5 μ l |
| 706R (10 pmol. μ l ⁻¹) | 2,5 μ l |
| DMSO | 1 μ l |
| LA polymeráza | 0,5 μ l |
| H ₂ O | do 50 μ l |
| DNA | 3 μ l |

Tab. 3: Nastavení termocykléru pro LA polymerázu

| Počet cyklů | Teplota | Čas |
|-------------|---------|----------|
| 1 | 94 °C | 1 min |
| 31 | 94 °C | 15 sec |
| | 55 °C | 1 min |
| | 68 °C | 2:30 min |
| 1 | 72 °C | 20 min |

Tab. 4: Složení reakční směsi pro Taq polymerázu

| Chemikálie | Objem |
|----------------------------------|----------|
| Combi PPP Master Mix | 12,5 µl |
| 355F (10 pmol.µl ⁻¹) | 0,625 µl |
| MB(10 pmol.µl ⁻¹) | 0,625 µl |
| H ₂ O | 8,25 µl |
| DNA | 3 µl |

Tab. 5: Nastavení termocykléru pro Taq polymerázu

| Počet cyklů | Teplota | Čas |
|-------------|---------|--------|
| 1 | 94 °C | 4 min |
| 31 | 94 °C | 1 min |
| | 55 °C | 1 min |
| | 72 °C | 4 min |
| 1 | 72 °C | 15 min |

Pokud standardní postup amplifikace u některých izolátů opakovaně nefungoval (elektroforéza byla negativní i po opětovné izolaci DNA), byly tyto amplifikovány pomocí touchdown PCR. Touto metodou se dařilo amplifikovat alespoň část izolátů, které byly do té doby vždy negativní.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro touchdown PCR s Taq polymerázou

| Chemikálie | Objem |
|------------------------------------|----------|
| Combi PPP Master Mix | 12,5 µl |
| EK 42F (10 pmol.µl ⁻¹) | 0,625 µl |
| 706R (10 pmol.µl ⁻¹) | 0,625 µl |
| H ₂ O | 8,25 µl |
| DNA | 3 µl |

Tab. 7: Nastavení termocykléru pro touchdown PCR s Taq polymerázou

| Počet cyklů | Teplota | Čas |
|-------------|------------------------------|--------|
| 1 | 94 °C | 4 min |
| 15 | 94 °C | 1 min |
| | 62 °C (-0,5 °C každý cyklus) | 50 s |
| | 72 °C | 3 min |
| 21 | 94 °C | 1 min |
| | 55 °C | 30 s |
| | 72 °C | 3 min |
| 1 | 72 °C | 20 min |

Úspěšnost amplifikace byla ověřována pomocí horizontální gelové elektroforézy na 1% agarózovém gelu v TBE pufru. Vizualizace byla prováděna pomocí ethidiumbromidu a UV světla. Jako standard byl používán GeneRuler 100bp Plus DNA ladder (MBI Fermentas). Výsledek byl vyfotografován digitálním fotoaparátem a zpracován v programu Aplha Digi Doc RT.

Pokud byl amplifikován jeden fragment, vzorek byl přečištěn a poslán na sekvenaci. K přečišťování byly používány tyto kity:

- MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen, GER), protokol "QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Using a microcentrifuge "
- Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Geneaid, TWN), protokol "PCR Clean Up Protocol"

DNA byla eluována do 25 µl. Ke zjištění koncentrace přečištěné DNA byl používán přístroj NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific – NanoDrop products).

3.4.3. Klonování DNA

V případě, že bylo amplifikováno více fragmentů DNA, byly tyto fragmenty vyřezány z gelu. Následně byly purifikovány pomocí kitu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA) a klonovány do kompetentních buněk *Escherichia coli* JM109 Competent Cells (Promega, USA). Používán byl kit pGEM® T-Easy Vector System (Promega, USA).

Ligační směs

Po vyřezání a přečištění DNA byla podle protokolu připravena ligační směs. Bylo smícháno 5 μl ligačního pufru, 1 μl vektoru (plazmidy pGEM), 1 μl T4 ligázy a podle koncentrace 1,5 μl – 3 μl DNA. V případě potřeby byla směs naředěna sterilní vodou do výsledného objemu 10 μl . Ligační směs byla posléze inkubována přes noc (přibližně po dobu 24 hodin) ve 4 °C.

Bakteriální kolonie

Do 200 μl kompetentních buněk bylo přidáno 10 μl ligační směsi a vše se nechalo 20 minut stát na ledu. Posléze byl proveden teplotní šok kompetentních buněk při 42 °C na 45 sekund. Následovaly další 2 minuty na ledu. Poté byla zkumavka s kompetentními buňkami doplněna LB médiem do celkového objemu 1 ml a směs byla inkubována na třepačce po dobu 1,5 hodiny při 37 °C a při 225 rpm. Postup přípravy Petriho misek s živným médiem (agar a LB Broth) byl následující:

- Byla namíchána směs 25 μl ampicilinu (koncentrace 200 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 100 μl IPTG (koncentrace 23,83 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 20 μl X-Gal (koncentrace 50 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tato směs byla rozetřena na Petriho misky.
- Na takto připravené Petriho misky bylo nejprve nanášeno 150 μl bakteriální směsi. Zbytek směsi byl stočen na 6000 rpm na 3 minuty. Po stočení byl odebrán supernatant a směs byla resuspendována. Vše bylo poté nanášeno na další Petriho misky.
- Petriho misky byly následně umístěny víčkem vzhůru do termostatu do teploty 37 °C. Po 30 minutách byly otočeny dnem vzhůru, aby se zabránilo kondenzování vody na víčku a stékání na kolonie.
- Inkubace Petriho misek trvala přes noc, cca 16 hodin.

Colony PCR

Z kolonií narostlých na Petriho miskách bylo vybráno zpravidla 5 – 10 bílých kolonií, ze kterých byla sterilní špičkou pipety část odebrána a přenesena do 9 μl sterilní vody. Aby bylo možno ověřit přítomnost plasmidů v bakteriálních buňkách, byl použit na termocykléru

program sloužící k degradaci buněčných stěn a následnému uvolnění DNA. Nastavení termocykléru v tab. 8.

Tab. 8: Nastavení termocykléru pro degradaci buněk

| Počet cyklů | Teplota | Čas |
|-------------|---------|---------|
| 1 | 96 °C | 5 min |
| | 50 °C | 1,5 min |
| | 96 °C | 1,5 min |
| | 45 °C | 1 min |
| | 96 °C | 1 min |
| | 40 °C | 1 min |

Následně byla namíchána reakční směs pro *colony* PCR (viz tab. 9) přidáváním chemikálií k degradovaným buňkám. Nastavení termocykléru v tab. 10.

Tab. 9: Reakční směs pro *colony* PCR

| Chemikálie | μl |
|----------------------------------|-----|
| Combi PPP Master Mix | 10 |
| SP6 (3,2 pmol.μl ⁻¹) | 0,5 |
| T7 (3,2 pmol.μl ⁻¹) | 0,5 |
| Degradované buňky | 9 |

Tab. 10: Nastavení termocykléru pro *colony* PCR

| Počet cyklů | Teplota | Čas |
|-------------|---------|--------|
| 1 | 94 °C | 4 min |
| 31 | 94 °C | 1 min |
| | 50 °C | 1 min |
| | 72 °C | 4 min |
| 1 | 72 °C | 25 min |

Izolace plazmidů

Z kolonií, které se po amplifikaci na elektroforéze ukázaly být svou délkou nejvhodnější, byly vybrány tři kolonie k izolaci. Tyto byly přeneseny z Petriho misek do 4 ml LB média společně s 4 μl ampicilinu (koncentrace 200 mg.ml⁻¹) a ponechány přes noc na třepačce při 37 °C a 225 rpm. Poté bylo odebráno přibližně 1,5 ml narostlých kolonií do 2ml

mikrozkumavky. Buňky byly stočeny na 6000 rpm po dobu 3 minut. Byl odebrán supernatant a znovu přidány narostlé kolonie do celkového objemu 1,5 ml. Vše bylo znovu stočeno, poté byl odlit supernatant a izolace pokračovala pomocí kitu ZR Plasmid Miniprep™- Classic (Zymo Research, USA) podle přiloženého protokolu. Izolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

3.4.4. Sekvenace DNA

Sekvenace byla prováděna v Laboratoři sekvenace DNA PřF, UK, na sekvenátoru 3130 Genetic Analyzer nebo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sekvenační směs byla připravována smícháním templátové DNA, primerů (v koncentraci 3,2 pmol) a sterilní vody do celkového objemu 14 µl, respektive 8 µl. Množství DNA ve směsi se pohybovalo kolem 100 ng, v případě plasmidové DNA pak kolem 500 ng. Pro přehled primerů používaných při sekvenaci viz tab. 11.

Tab. 11: Přehled primerů používaných pro sekvenaci DNA

| Primer | Citace | Sekvence 5' - 3' |
|----------|----------------------|--------------------------|
| Medlin A | Medlin et al., 1988 | AYCTGGTTGAYYTGCCAG |
| Medlin B | Medlin et al., 1988 | TGATCCTTCTGCAGGTCCACCTAC |
| 355F | Kolísko, unpubl. | GAGAGACGGYTCA YA |
| 706R | Kolísko, unpubl. | ATCATCCTATTTACCCYDTCC |
| EK 42F | Marande et al., 2009 | CTCAARGAYTAAGCCATGCA |
| EK 1498R | Marande et al., 2009 | CACCTACGGAAACCTTGTTA |
| 1510R | Rudolf et al., 1995 | GGGCATCACAGACCTG |
| 1055F | nezjištěno | GGTGGTGCATGGCCG |
| 577R | Elwood et al., 1985 | ACCGCGGCKGCTGGC |
| SP6 | Wallace et al., 1981 | GATTTAGGTGACACTATAG |
| T7 | Wallace et al., 1981 | TAATACGACTCACTATAGGG |

3.4.5. Fylogenetická analýza

Osekvenované fragmenty SSU rDNA byly složeny v programu SeqMan a z konečných sekvencí byly odstraněny sekvence primerů. Pro fylogenetickou analýzu genu pro SSU rRNA byl použit dataset obsahující 113 sekvencí genu pro SSU rRNA s celkem 1108

pozicemi. Kromě našich izolátů byly v analýze použity sekvence diplomonád a environmentální sekvence získané z databáze *GenBank*. Environmentální sekvence byly vybrány s pomocí metody blast s použitím volně žijících diplomonád proti nr GenBank databázi. Duplicity a sekvence organismů nespádajících do řádu Diplomonadida byly odhaleny na základě předběžné fylogenetické analýzy a byly z datasetu odstraněny. Alignment byl proveden pomocí metody MAFFT (Kato et al., 2002) na serveru <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Byl použit algoritmus G-INS-i, ostatní parametry nebyly změněny. Výsledný alignment byl poté ručně upraven v programu BioEdit. Byly odstraněny variabilní oblasti, u kterých nebyla jistota správného alignmentu. U neúplných sekvencí byly prázdné pozice nahrazeny neurčitými bázemi (n).

Fylogenetický strom byl konstruován metodou *maximum likelihood* (ML) a Bayesovskou metodou (BA). ML analýza byla provedena v programu RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006), použit byl evoluční model GTRGAMMAI. Statistická podpora topologie byla odhadnuta pomocí bootstrap analýzy s 1000 pseudoreplikáty v programu RAxML. BA analýza byla provedena v programu MrBayes 3.2.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) s použitím evolučního modelu GTR + Γ + I + covarion se čtyřmi rychlostními kategoriemi. Čtyři MCMC řetězce běžely po dobu $5 \cdot 10^6$ generací se vzorkováním každou 500. generací, dokud odchylka mezi řetězci za posledních 75 % generací neklesla pod jedno procento. Prvních 25 % stromů bylo odstraněno jako „burn-in“.

4. Výsledky

4.1. Sběr a kultivace izolátů

Většina vzorků sedimentu byla sladkovodní (pouze jeden brakický) a pochází z Evropy, ale máme vzorky například i z Indie, Kamerunu nebo Bolívie. Několik izolátů jsem získala osobně (MALSE, PETRYB, POMPEJE), většinu jsem však obdržela od ostatních členů našeho týmu v kultuře, přibližně ve stádiu 3. – 4. pasáže. V naší analýze se vyskytují také izoláty, které jsem nekultivovala osobně. Jedná se o všechny endobiotické izoláty a o několik izolátů volně žijících. V těchto případech jsem od kolegů buď obdržela izolovaný vzorek DNA, se kterým jsem dále pracovala (izolát VAV2A), nebo rovnou sekvenci genu pro SSU rRNA. Celkem bylo shromážděno 68 izolátů obsahujících zástupce rodu *Diplomonadida*. Soupis všech získaných izolátů je uveden v tab. 12.

Odebrané vzorky byly inokulovány do živného média a pravidelně pozorovány pod mikroskopem. Kultura byla přibližně první tři pasáže pozorována jednou týdně, poté jednou za dva týdny. Stabilizace kultur byla proměnlivá. Pokud byla úspěšná, trvala 3 – 4 měsíce. I poté se občas objevovaly značné výkyvy v četnosti buněk. Některé kultury byly stabilní po několik měsíců a pak během velmi krátké době náhle vymřely. Nejčastěji se to stávalo u rodu *Hexamita*. Pouze menší část stabilních kultur dlouhodobě narůstala do větších hustot. Proto bylo často nezbytné počkat s další prací, dokud se četnost buněk nezvýšila.

Ve většině izolátů se kromě diplomonád vyskytovaly také další eukaryotické organismy. Především se jednalo o zástupce ze skupin Heterolobosea, Euglenozoa, Ciliophora, Cercozoa a Archamoebae.

Většina izolátů byla kultivována v ATCC 802 médiu. Pouze izolát NORSKO byl kultivován v brakickém médiu a izolát CONGO v 3% LB médiu. Izolát VAV2A a endobiotické izoláty byly kultivovány na dvoufázovém médiu Dobell-Leidlaw (Dobel & Leidlaw, 1926). Izolát VAV2A a endobiotické izoláty kultivovali kolegové z týmu.

Tab. 12: Přehled izolátů zahrnutých do analýzy. Vysvětlivky: ARG – Argentina, BOL – Bolívie, CAF – Středoafriická republika, CAN – Kanada, CMR – Kamerun, COD – Demokratická republika Kongo, COG – republika Kongo, CYP – Kypr, CZE – Česko, DEU – Německo, ESP – Španělsko, GRC – Řecko, HRV – Chorvatsko, CHL – Chile, IND – Indie, ITA – Itálie, MYS – Malajsie, PER – Peru, PRT – Portugalsko, THA – Thajsko, TZA – Tanzanská sjednocená republika. * značí izoláty, ze kterých jsem rovnou obdržela DNA nebo sekvenci.

| Druh | Izolát | Lokalita/Hostitel | Souřadnice |
|--------------------------------|-------------|---|-------------------|
| <i>Trepomonas agilis</i> | MIS2C | čistička Miškovice, CZE | N.A. |
| | SOOS4 | Soos NPR, CZE | 50°08'N, 12°24'E |
| <i>Trepomonas latecapitata</i> | BEAVER3 | Beaver Lake, Vancouver, CAN | N.A. |
| | PETRYB | Petrovice, Mladošovice, CZE | 48°55'N, 14°41'E |
| <i>Trepomonas rotans</i> | BOL2 | NP Eduardo Avaroa, BOL | 22°32'S, 67°38'W |
| | BOT2 | Botanická zahrada UK, Praha, CZE | 50°04'N, 14°24'E |
| | ENGLISH1 | Englishman River Falls Provincial Park, Vancouver Island, CAN | 49°14'N, 124°20'W |
| | FB | Madeira, PRT | 32°44'N, 16°53'E |
| | KIEL9 | Behrendsdorf, DEU | 54°21'N 10°36'E |
| | MALSE | řeka Malše, České Budějovice, CZE | 48°57'N, 14°28'E |
| | SCHOONER41 | Pacific Rim NP, Vancouver Island, CAN | 49°04'N, 125°46'W |
| | VLADA4 | Lütjenhof, DEU | 54° 22'N, 11°04'E |
| | *VT2 | rybník Velký Tisý, CZE | 49°03'N, 14°43'E |
| <i>Trepomonas steinii</i> | CONGO | řeka Kongo, Brazzaville, COG | N.A. |
| | GOLAKASAJ | Golakasaj, Rajastán, IND | N.A. |
| | KAIYKATAAN | Kaiykata, district Darjeeling, IND | N.A. |
| | KAMERUN3 | CMR | N.A. |
| | *KUN | Orlické hory, CZE | 50°14'N, 16°27'E |
| | LOUISE1 | Lake Louise, Alberta, CAN | 51°24'N, 116°14'W |
| | LOUISE2 | Lake Louise, Alberta, CAN | 51°24'N, 116°14'W |
| | LUKIFOREST | Luki, COD | N.A. |
| | *LUH4 | řeka Vltava, CZE | 48°48'N 13°57'E |
| | MBURUCU1 | NP Mburucuyá, ARG | 28°01'N, 58°01'E |
| | MOSSE1 | CAF | N.A. |
| <i>Trepomonas</i> sp. PPS6 | *AMAZONIEBA | Tambopata Reserve, PER | 12°50'S, 69°17'W |

| Druh | Izolát | Lokalita/Hostitel | Souřadnice |
|----------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------------|
| <i>Trepomonas</i> sp. PPS6 | *BAZKOJ | Kojčice u Pelhřimova, CZE | 49°28'N, 15°15'E |
| | CAMERON | Cameron Highlands, MYS | 04°22'N, 101°20'E |
| | DAR | N.A. | N.A. |
| | ERAWAN | NP Erawan, THA | 14°23'N, 99°07'E |
| | GO2 | Kréta, Agios Nikolaos, GRC | 35°07'N, 25°43'E |
| | HRAD5AN | vrch Hradiště u Chomutova, CZE | 50°27'N, 13°20'E |
| | *CHORV | HRV | N.A. |
| | *IND5 | Bhangarh, IND | 27°05'N, 76°17'E |
| | KAMERUN2 | CMR | N.A. |
| | KAZACH | KAZ | N.A. |
| | KIEL1 | Behrens Dorf, DEU | 54°21'N, 10°36'E |
| | KIEL2 | Behrens Dorf, DEU | 54°21'N, 10°36'E |
| | *KOMPKOJ | skládky Kojčice, CZE | 49°28'N, 15°15'E |
| | *LIVADIAN | Livadia, CYP | 34°58'N, 33°39'E |
| | M3 | N.A. | N.A. |
| | MACHUPICCHU | Machu Picchu, PER | 13°09'S, 72°31'W |
| | POMPEJE | Pompeje, ITA | 40°45'N, 14°29'E |
| | SCHOONER4 | Pacific Rim NP, Vancouver Island, CAN | 49°04'N, 125°46'W |
| | TAMARA | N.A. | N.A. |
| | USA2 | Seattle, USA | 47°39'N, 122°17'W |
| | VIKOS | Vikos, GRC | 39°56'N, 20°42'E |
| <i>Gyromonas</i> sp. | VLADA7 | DEU | 54°31'N, 11°07'E |
| | GRUBER2 | Grüber, Brunnen, DEU | 48°48'N, 15°38'E |
| | *LUH2N | Luh u Vltavy za Lipnem, CZE | 48°48'N, 13°57'E |
| | SPINDL2 | Špindlerův Mlýn, CZE | 50°46'N, 15°24'E |
| <i>Hexamita</i> sp. | URUBAMBA | řeka Urubamba, PER | N.A. |
| | AYEN | Region Aysen, CHL | 45°27'S, 72°48'W |
| | BOTAN1 | Botanická zahrada UK, Praha, CZE | 50°04'N, 14°24'E |
| | KAMERUN4 | CMR | N.A. |
| | KLOSTERSEE | Klostersee, DEU | 54°10'N, 11°01'E |
| | NORSKO | NOR | N.A. |
| | SEB5 | rybník Šeberák, Praha, CZE | 50°00'N, 14°29'E |
| | TOLEDO | Toledo, ESP | 39°58'N, 03°39'W |
| | TUN2 | Chomutov, CZE | 50°27'N, 13°21'E |
| | ZOO1 | ZOO Praha, CZE | 50°06'N, 14°24'E |

| Druh | Izolát | Lokalita/Hostitel | Souřadnice |
|-----------------------------|-----------|---|-------------------|
| <i>Trimitus</i> sp. | *VAV2A | Vejvanov-Pajzov, CZE | 49 °51'N, 13°39'E |
| <i>Trepomonas</i> sp. | *ESMI3 | larva zlatohlávka | N.A. |
| | *EUDIA3 | larva zlatohlávka | N.A. |
| <i>Hexamita</i> sp. | *PI1kl3 | pijavka koňská | N.A. |
| | *PI1kl5 | pijavka koňská | N.A. |
| Enteromonadidae gen. sp. | *CERAT3 | žába <i>Ceratophrys ornata</i> , z chovu v Praze | N.A. |
| neurčeno | *SCHULTZ2 | larva zlatohlávka | N.A. |
| neurčeno | *TIPLICE | larva tiplice | N.A. |

4.2. Fylogenetická analýza

Celkem jsme určili 65 nových sekvencí genu pro SSU rRNA diplomonád, všechny ze skupiny Hexamitinae. Na obrázku 6 je zobrazen výsledek naší fylogenetické analýzy.

Skupina Hexamitinae vyšla v naší analýze jako robustně monofyletická. V souladu s předchozími studiemi (např. Jørgensen & Sterud, 2007; Kolisko et al., 2008) se skupina Hexamitinae rozdělila na tři větve: (1) Statisticky vysoce podpořená linie obsahující druhy *Spironucleus salmonicida*, *S. barkhanus* a *S. torosa* (bootstrap/Bayesova posteriorní pravděpodobnost: BS 100/BPP 1), (2) opět statisticky podpořená linie s druhy *S. vortens* a *S. salmonis* (BS 100/BPP 1), (3) linie zahrnující všechny ostatní zástupce skupiny Hexamitinae – zbylé druhy rodu *Spironucleus* (*S. muris* a *S. meleagridis*) a rody *Trepomonas*, *Hexamita*, *Gyromonas*, *Enteromonas*, *Trimitus*, nepopsané unizoické diplomonády PYX, PSEUD a CERAT3 a environmentální sekvence. Tato linie byla vysoce podpořena v Bayesovské analýze (BPP 1), avšak pouze slabě v ML analýze (BS 63).

Vztahy uvnitř třetí linie Hexamitinae zůstaly v naší analýze nerozřešené a většina vnitřních uzlů nezískala podporu. Topologie fylogenetických stromů zkonstruovaných jednotlivými metodami se od sebe navíc lišily. Zřejmě nejvýraznější rozdíl byl v pozici linie *Spironucleus muris*/*S. meleagridis*. Ta se v ML analýze umístila jako sesterská zbylým taxonům celé linie (3), ovšem bez statistické podpory, kdežto v Bayesovské analýze se odvětvovala uvnitř druhu *Trepomonas latecapitata*, opět bez podpory.

V souladu s analýzou Kolisko et al. (2008) nevytvořily enteromonády monofyletickou skupinu, ale rozdělily se do nepříbuzných linií, rodů – *Trimitus*, *Enteromonas*, dosud

nepopsaný rod zastoupený izoláty PSEUD a PYX a nově linie (nejspíš také dosud nepopsaná) zastoupená izolátem CERAT3. Ta byla sice poměrně blízce příbuzná přechází linii (izolátům PSEUD a PYX), ale bez statistické podpory. Izolát VAV2A se s vysokou podporou umístil do rodu *Trimitus*.

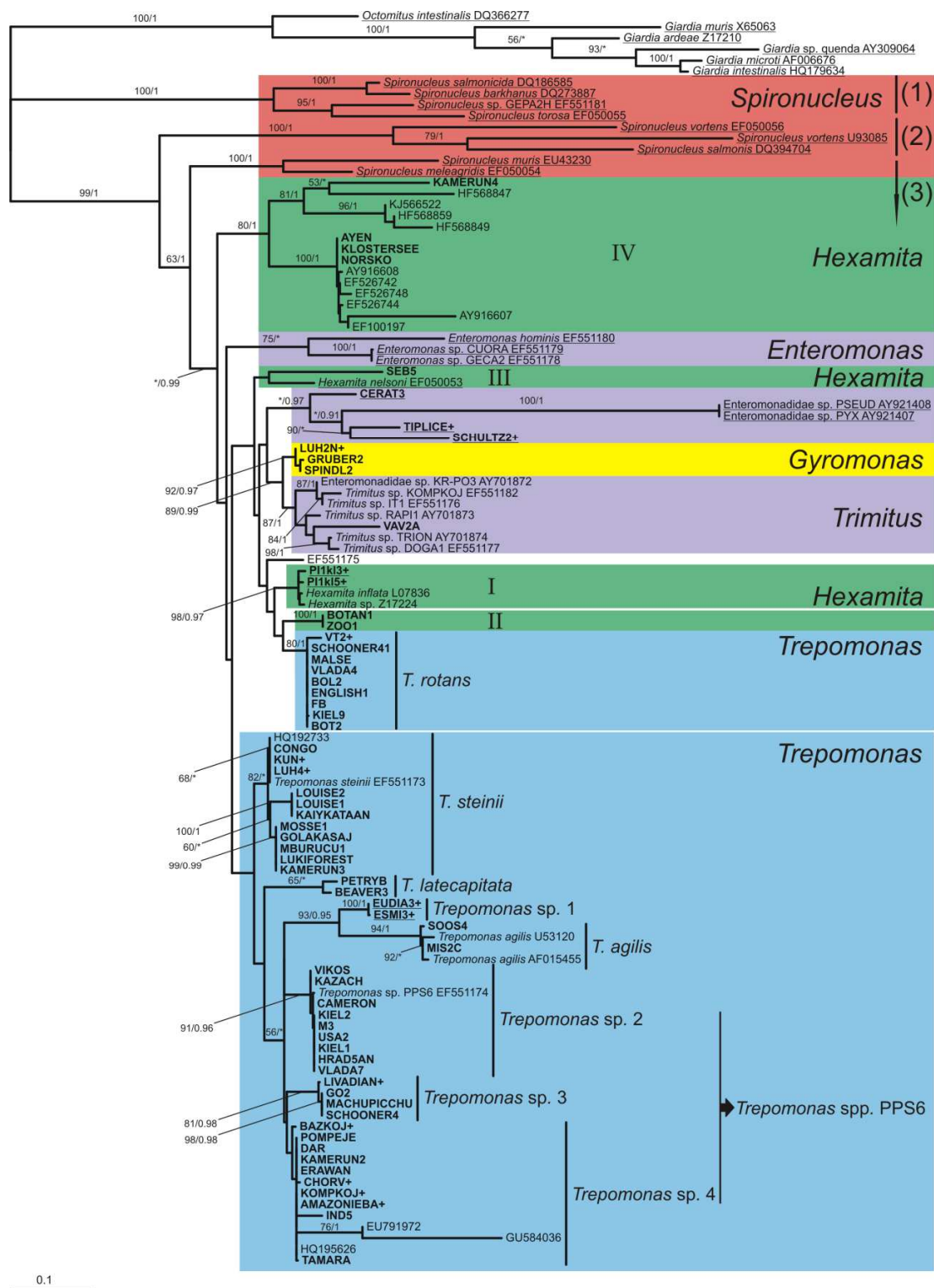
Rod *Hexamita* byl též tvořen několika oddělenými liniemi (I – IV). První linie se skládala z volně žijícího druhu *Hexamita inflata*, kterému byly s vysokou podporou (BS 98/BPP 0.97) blízce příbuzné endobiotické hexamity z pijavek (izoláty PI1kl3 a PI1kl5). Další linie hexamit tvořily izoláty BOTAN1 a ZOO1. Třetí samostatná linie hexamit byla tvořena endobiotickým druhem *Hexamita nelsoni* a volně žijícím izolátem SEB5, tato větev ovšem nemá statistickou podporu. Čtvrtá linie byla dobře podpořena a spadaly do ní dvě větve s větším množstvím environmentálních sekvencí a izoláty KAMERUN4, AYEN, KLOSTERSEE a NORSKO.

Rod *Trepomonas* rovněž nepředstavoval monofyletickou linii. Druh *T. rotans* se totiž odvětvoval zvlášť, jako příbuzný hexamitám z linií I a II, i když tato pozice nebyla statisticky podpořena (vyšla však v Bayesovské i ML analýze). Do blízké příbuznosti zmíněných linií rodu *Hexamita* se tento druh umístil i v dřívějších průběžných analýzách. Zbytek druhů rodu *Trepomonas* tvořil jednu větev "pravých trepomonád", i když bez statistické podpory. V Bayesovské analýze se uvnitř této větve odvětvují *Spironucleus meleagridis* a *S. muris*, i když bez statistické podpory (viz výše). Tato větev trepomonád obsahovala druhy *T. steinii*, *T. latecapitata* a *T. agilis*, a také čtyři linie, které zřejmě představují samostatné, dosud nepopsané druhy rodu *Trepomonas*. Přiřadili jsme jim pracovní označení *Trepomonas* sp. 1 – 4. Endobiotické izoláty rodu *Trepomonas* (*Trepomonas* sp. 1) vytvořily společnou větev, která byla s vysokou podporou blízce příbuzná druhu *T. agilis* (BS 93/BPP 0.95). Dobře statisticky podpořené jsou také linie *Trepomonas* sp. 2 a 3, monofylie linie *Trepomonas* sp. 4 sice podporu nemá, ale jednotlivé sekvence byly téměř identické (environmentální sekvence GU584036, která tvoří delší větev, je krátká a nejspíš horší kvality). Do linie *Trepomonas* sp. 2 se připojil necharakterizovaný izolát PPS6 (Kolisko et al., 2008). Druh *T. steinii* měl dobrou podporu v ML analýze (BS 82), ale slabou podporu v Bayesovské analýze (BPP < 50). Je patrné vnitřní členění tohoto druhu na tři linie.

Diplozoický druh *Gyromonas ambulans* se v obou analýzách s vysokou podporou umístil jako sesterský unizoickému rodu *Trimitus* (BS 89/BPP 0.99). Větev *Gyromonas/Trimitus*

obsahující volně žijící i endobiotické organismy je sesterská linii diplomonád CERAT3/PSEUD+PYX/TIPLICE/SCHULTZ2. Tato příbuznost ale nebyla ani v Bayesovské, ani ML analýze podpořena.

Environmentální sekvence HQ195626, GU584036 a EU791972 se zařadily do linie *Trepomonas* sp. 4. Sekvence HQ192733 vytvořila samostatnou větev příbuznou (i když bez podpory) hexamitám linií I a II a druhu *Trepomonas rotans*. Ostatní environmentální sekvence zařadily mezi hexamity linie IV.



Obr. 6: Fylogenetická analýza genu pro SSU rRNA řádu Diplomonadida. Strom byl sestaven metodou maximum likelihood s modelem GTRGAMMAI v programu RAxML. Jako outgroup byly použity sekvenční skupiny Giardiae. Čísla na větvích představují hodnotu bootstrapové podpory/Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti. Hodnoty < 50/0.90 jsou označeny * popř. nejsou vyznačeny. Nově určené sekvenční skupiny jsou označeny tučně. + jsou označeny izoláty, ze kterých jsem obdržela izolovanou DNA/sekvenci. Environmentální sekvenční skupiny jsou uvedeny pouze jako přístupové kódy z databáze NCBI. Jednotlivé linie Hexamitinae jsou označeny (1), (2) a (3). U rodu *Trepomonas* byly pro přehlednost do stromu vyznačeny i jednotlivé druhy.

4.3. Morfologická charakterizace

Živé buňky byly pozorovány a fotografovány s pomocí světelného mikroskopu pod Nomarského DIC, protargolem barvené preparáty byly pozorovány ve světlém poli. Zaznamenávali jsme zejména tvar a velikost buňky, tvar cytostomů/kapes a u živých buněk také způsob pohybu. Jádra a bičíky byly na živých buňkách hůře patrné, k jejich vizualizaci nám (alespoň částečně v případě bičíků) pomohla metoda barvení protargolem (viz obr. 14 a 15). Vzhledem k jejich vysoké pohyblivosti jsme se často potýkali během fotografování živých buněk se značnými obtížemi.

Při popisu buněk bylo nezbytné definovat si jednotlivé úhly pohledů. Jako čelní byl v této práci označen pohled, kdy jsou vidět obě celá jádra a kdy se kapsy a bičíky (jsou-li viditelné) nepřekrývají (viz obr. 7A). Jako boční byl označen úhel pohledu, který je o 90° otočen vůči pohledu čelnímu (viz obr. 7H).

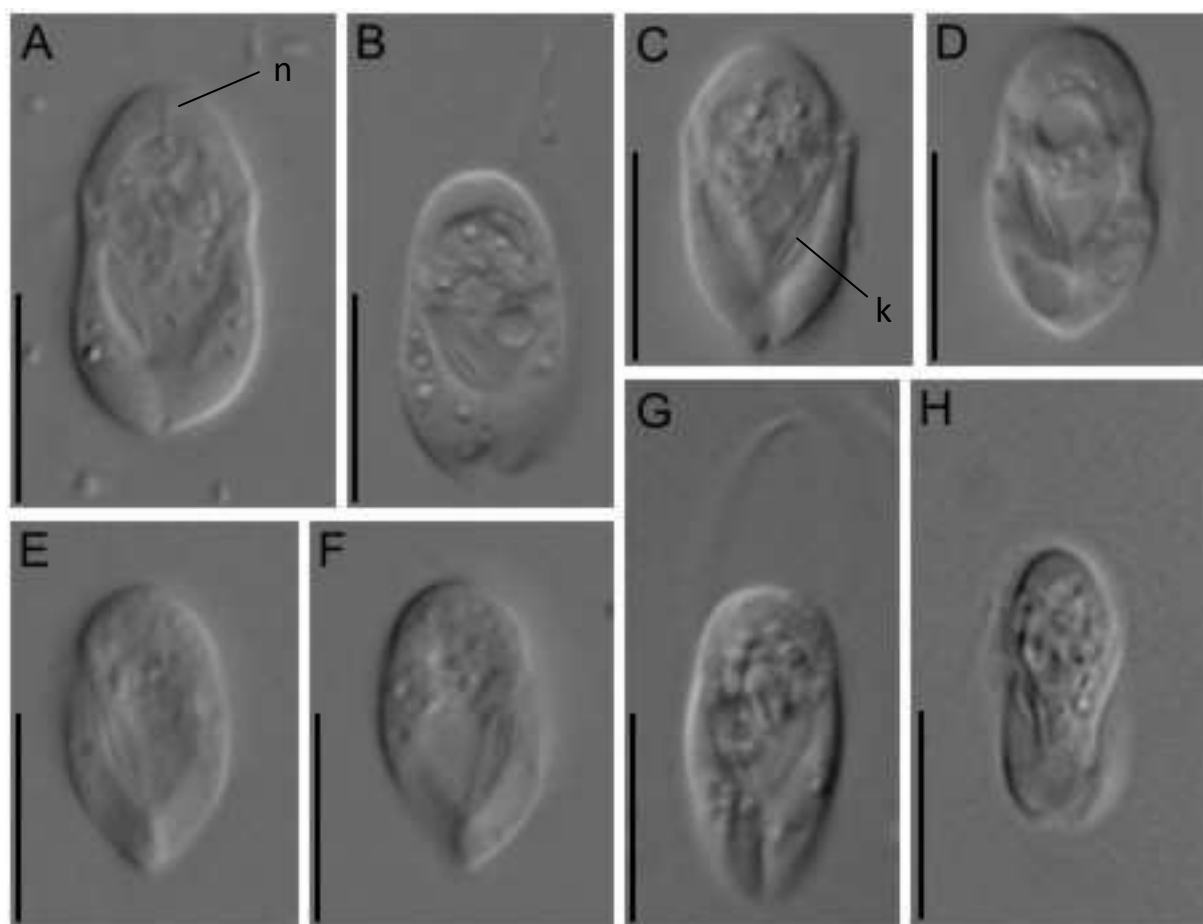
Cílovou skupinou této práce jsou volně žijící diplozoické diplomonády. Z tohoto důvodu ve výsledcích práce nejsou žádná morfologická data z unizoických a endobiotických izolátů, pouze z nich byla použita sekvence DNA pro fylogenetickou analýzu. Přímou kulturu bylo možno určit, zda se jedná o morfotyp druhu *Hexamita*, *Trepomonas* nebo *Gyromonas*, případně o unizoickou diplomonádu. Zde proto uvádím stručný seznam: V kultuře volně žijícího izolátu VAV2A se vyskytovaly unizoické diplomonády. Kultura endobiotického izolátu CERAT3 obsahovala unizoické diplomonády vzhledu rodu *Trimitus*. Primokultury endobiotických izolátů TIPLICE a SCHULTZ2 vymřely (Smejkalová, osobní sdělení) a diplomonády, které se v nich nacházely, proto nemohly být určeny. V kulturách endobiotických izolátů PI1kl3 a PI1kl5 byly dlouhodobě pozorovány buňky rodu *Hexamita* a v kulturách izolátů ESMI3 a EUDIA3 byly pozorovány buňky vzhledu rodu *Trepomonas*. Poslední dva zmíněné izoláty brzy vymřely.

Tab. č. 13: Rozměry živých a protargolem barvených buněk. Vysvětlivky: DB – délka buňky, SB – šířka buňky, n – počet buněk.

| Druh | Izolát | DB (μm) | SB (μm) | DB/SB | n |
|----------------------------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|----|
| Živé buňky | | | | | |
| <i>Trepomonas agilis</i> | SOOS4 | 15,6 ± 0,8 (14,8 - 16,4) | 8,4 ± 0,7 (7,7 - 9,1) | 1,9 ± 0,1 (1,8 - 2,0) | 30 |
| | MIS2C | 16,1 ± 1,8 (14,3 - 17,9) | 9,1 ± 1,2 (7,9 - 10,3) | 1,8 ± 0,2 (1,6 - 2,0) | 30 |
| <i>Trepomonas latecapitata</i> | PETRYB | 15,4 ± 1,0 (14,4 - 16,4) | 8,4 ± 1,0 (7,4 - 9,4) | 1,9 ± 0,2 (1,7 - 2,1) | 30 |
| <i>Trepomonas rotans</i> | FB | 13,6 ± 1,4 (12,2 - 15,0) | 9,5 ± 1,0 (8,5 - 10,5) | 1,4 ± 0,1 (1,3 - 1,5) | 30 |
| | BOL2 | 10,9 ± 0,8 (10,1 - 11,7) | 7,6 ± 0,9 (6,7 - 8,5) | 1,4 ± 0,1 (1,3 - 1,5) | 30 |
| <i>Trepomonas steinii</i> | KAIYKATAAN | 10,7 ± 1,0 (9,7 - 11,7) | 6,3 ± 0,8 (5,5 - 7,1) | 1,7 ± 0,2 (1,5 - 1,9) | 30 |
| | LOUISE1 | 11,4 ± 1,0 (10,4 - 12,4) | 6,9 ± 0,7 (6,2 - 7,6) | 1,7 ± 0,1 (1,6 - 1,8) | 30 |
| | CONGO | 9,6 ± 0,7 (8,9 - 10,3) | 6,6 ± 0,9 (5,7 - 7,5) | 1,5 ± 0,2 (1,3 - 1,7) | 30 |
| <i>Trepomonas</i> spp. PPS6 | MACHUPICCHU | 11,2 ± 1,0 (10,2 - 12,2) | 5,4 ± 0,7 (4,7 - 6,1) | 2,1 ± 0,2 (1,9 - 2,3) | 30 |
| | VIKOS | 11,1 ± 0,8 (10,3 - 11,9) | 6,0 ± 0,6 (5,4 - 6,6) | 1,9 ± 0,1 (1,8 - 2,0) | 30 |
| | HRAD5AN | 13,4 ± 1,1 (12,3 - 14,5) | 6,5 ± 0,7 (5,8 - 7,2) | 2,1 ± 0,2 (1,9 - 2,3) | 30 |
| | DAR | 11,2 ± 0,7 (10,5 - 11,9) | 6,9 ± 0,5 (6,4 - 7,4) | 1,6 ± 0,1 (1,5 - 1,7) | 30 |
| <i>Gyromonas</i> sp. | SPINDL2 | 7,1 ± 0,7 (6,4 - 7,8) | 4,6 ± 0,5 (4,1 - 5,1) | 1,5 ± 0,1 (1,4 - 1,6) | 15 |
| Protargolem barvené buňky | | | | | |
| <i>Trepomonas agilis</i> | SOOS4 | 9,8 ± 1,0 (8,8 - 10,8) | 4,8 ± 0,5 (4,3 - 5,3) | 2,0 ± 0,2 (1,8 - 2,2) | 30 |
| <i>Trepomonas latecapitata</i> | PETRYB | 10,0 ± 0,7 (9,3 - 10,7) | 4,8 ± 0,6 (4,2 - 5,4) | 2,1 ± 0,2 (1,9 - 2,3) | 9 |
| <i>Trepomonas rotans</i> | FB | 7,1 ± 0,5 (6,6 - 7,6) | 4,9 ± 0,5 (4,4 - 5,4) | 1,5 ± 0,1 (1,4 - 1,6) | 30 |
| <i>Trepomonas steinii</i> | LUH3 | 4,2 ± 0,4 (3,8 - 4,6) | 2,7 ± 0,3 (2,4 - 3,0) | 1,6 ± 0,2 (1,4 - 1,8) | 13 |
| <i>Trepomonas</i> spp. PPS6 | HRAD5 | 7,4 ± 0,5 (6,9 - 7,9) | 3,1 ± 0,2 (2,9 - 3,3) | 2,4 ± 0,2 (2,2 - 2,6) | 9 |

Trepomonas agilis Dujardin, 1841

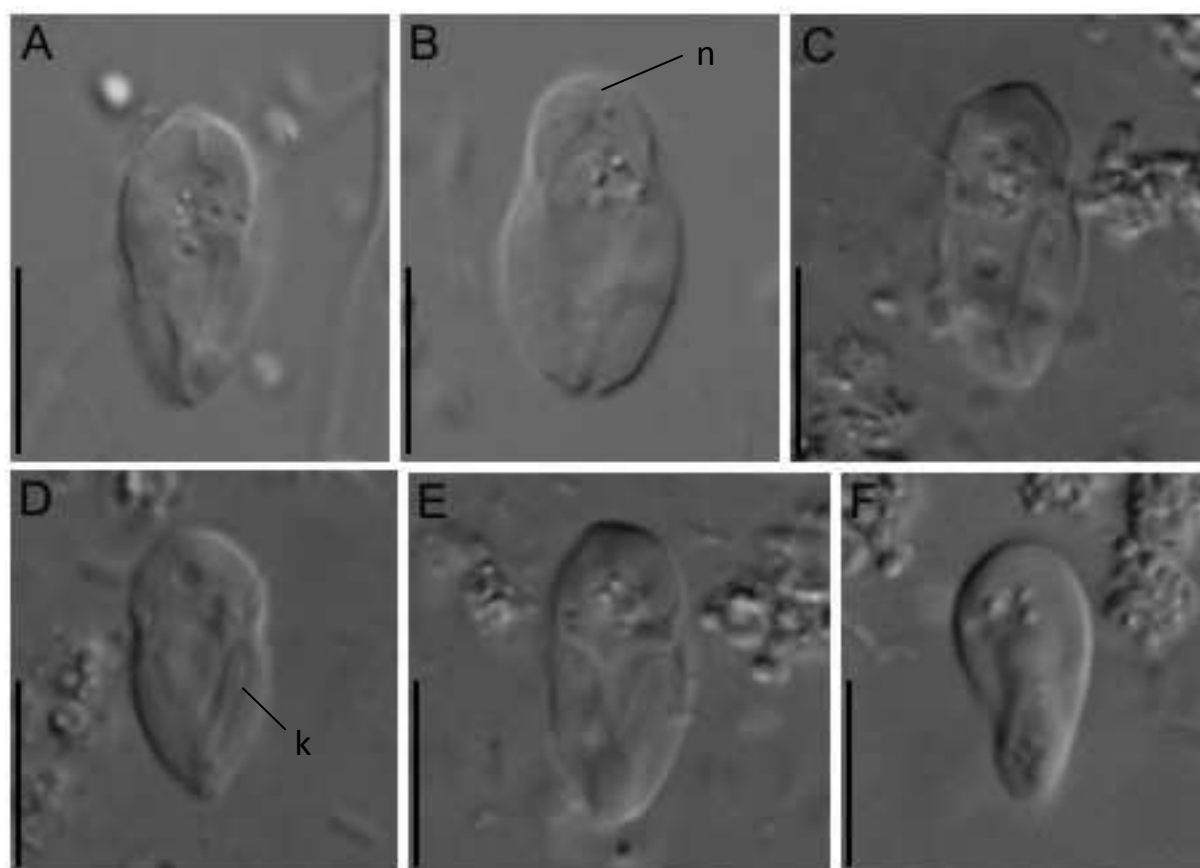
Zástupci tohoto druhu byli pozorováni pouze ve dvou kulturách – MIS2C a SOOS4. Jedná se o největší námi pozorovanou diplomonádu – živé buňky byly dlouhé kolem 15 – 16 μm . Byly lehce zploštělé a měly oválný tvar, často se zúžením v oblasti horního konce kapes. Jádra byla úzká a hodně protažená do stran (viz obr. 7A a 14A). Kapsy s bičíky měly délku přibližně jedné třetiny buňky a byly relativně úzké. Směřovaly k sobě v ostrém úhlu, ale nepřekrývaly se, takže při čelním pohledu tvořily tvar V (viz obr. 7C). Ve světelném mikroskopu byly na maximální zvětšení patrné především bičíky v kapsách. Pohyb buněk byl rychlý, přímo vpřed bez zastavování s relativně rychlými, ale plynulými změnami směru. Buňky při pohybu zvolna rotovaly.



Obr. 7: *Trepomonas agilis*. A – D izolát SOOS4; E – G izolát MIS2C; H izolát SOOS 4, boční pohled; n – jádra, k – kapsa s bičíky. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

Trepomonas latecapitata Skuja, 1956

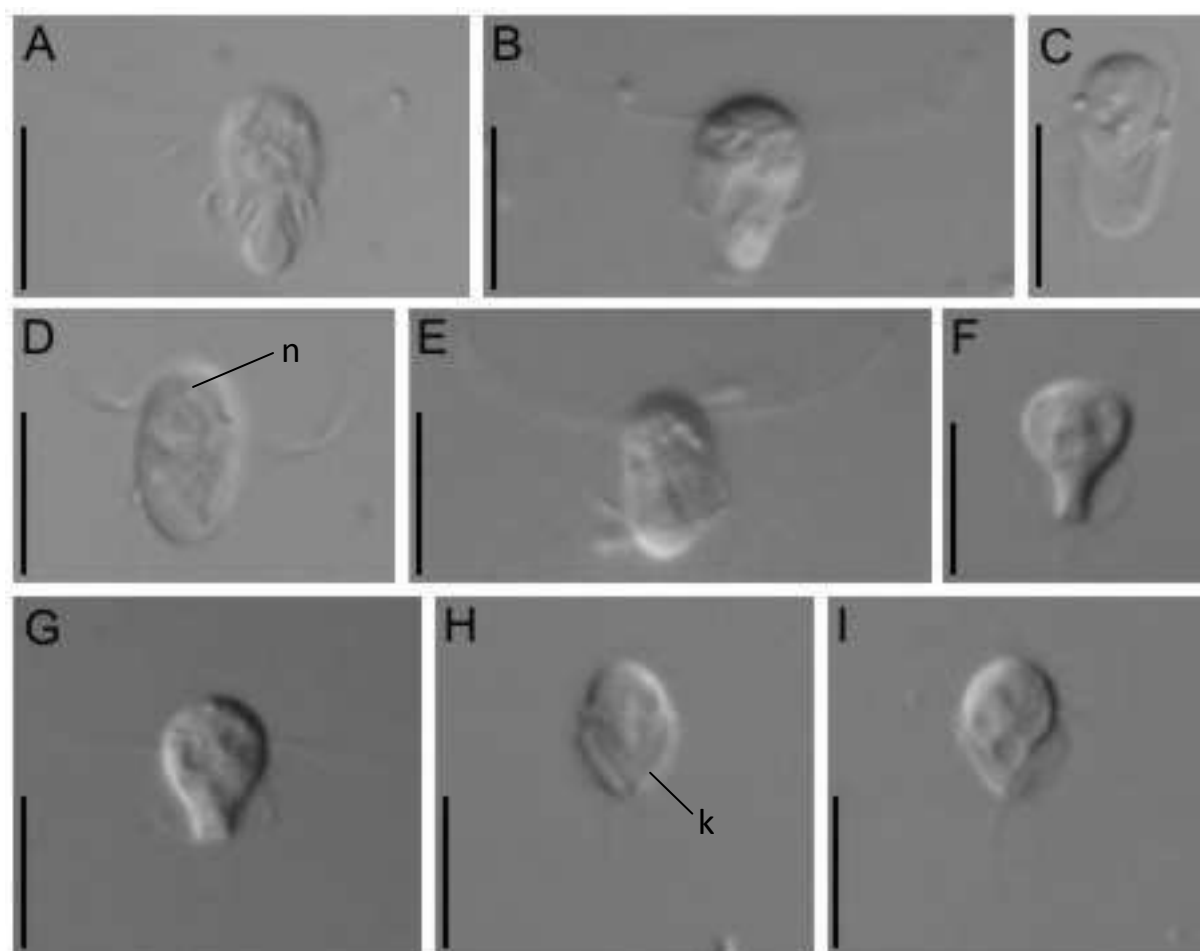
Zástupci tohoto druhu byli pozorováni pouze ve dvou kulturách – BEAVER3 a PETRYB. Buňky byly velké, kolem 15 μm , ale průměrnou velikostí nepřesahovaly *Trepomonas agilis*. Tento druh byl málo zploštělý, buňka byla silně spirálně zakroucená. Tvar byl při čelním pohledu oválný, většinou s lehkým zaškrcením v oblasti horní části kapes. Jádra byla hodně protažená do stran, ale vypadala širší než u *Trepomonas agilis* a svírala ostřejší úhel (viz obr. 8B a 14G). Kapsy byly velmi úzké, štěrbinovité a jejich délka přesahovala polovinu délky buňky. Směřovaly k sobě v ostrém úhlu a díky spirální stavbě buňky se při čelním pohledu překrývaly. Dva bičíky v kapsách byly dobře patrné, zbylé dva páry mimo kapsy byly méně zřetelné a bylo možné je zahlédnout občas při pohybu. Ze všech druhů rodu *Trepomonas* se tento druh pohyboval nejpomaleji, změny směru byly málo časté a pomalé. Rotace při pohybu byla výrazná a díky spirálnímu zakroucení buňky měla charakteristický průběh.



Obr. 8: *Trepomonas latecapitata*. A, B izolát BEAVER3, čelní pohled; C – E izolát PETRYB; F izolát PETRYB, boční pohled; n – jádra, k – kapsa s bičíky. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

Trepomonas steinii Klebs, 1892

Tento druh byl pozorován celkem v jedenácti kulturách (viz tab. 12). Živé buňky byly dlouhé přibližně 10 μm – buňky tohoto druhu jsou nejmenší ze všech námi zkoumaných druhů rodu *Trepomonas*. Buňky byly lehce zploštělé a měly na první pohled charakteristický kapkovitý až trojúhelníkovitý tvar. Zadní konec byl užší než přední. Trojúhelníkovitý tvar byl nejčastější pozorovaný (viz obr. 9A), nicméně byly vyfotografovány i buňky oválného tvaru (viz obr. 9D). Na těchto byly na rozdíl od trojúhelníkovitých dobře patrné kapsy – jejich tvar, délka a pozice – a občas i jádra. Proto se domnívám, že čelní pohled byl druhý zmíněný a trojúhelníkovitý tvar má buňka při pohledu bočním, přičemž zřejmě během pozorování zaujímá častěji toto o 90° otočené postavení. Jádra byla vždy špatně viditelná, ale byl zaznamenán do stran protažený tvar (hlavně na protargolových preparátech, viz obr. 14E). Kapsy sahaly od zadního konce až téměř do poloviny buňky. Byly úzké, štěrbinovité a směřovaly k sobě v ostrém úhlu. U zadního konce buňky se kapsy stýkaly, zda se překrývaly, nebylo patrné.

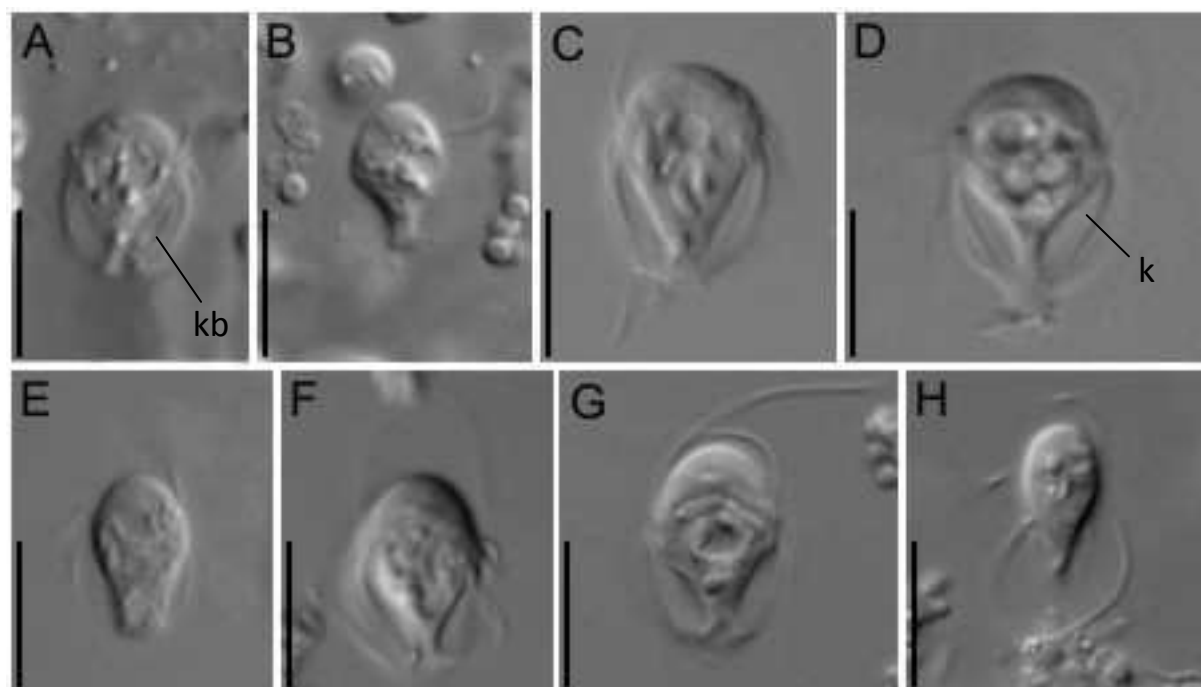


Obr. 9: *Trepomonas steinii*. A – E izolát Kaiykataan; F – I izolát Congo. C, D, H, I domnělý čelní pohled; n – jádra, k – kapsa. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

Bičíky byly pod světelným mikroskopem v různých úhlech pozorovatelné všechny – pár dlouhých předních směřujících do stran, pár kratších směřujících z kapes vzad, přesahujících délkou okraj buňky, a dva páry krátkých bičíků v postranních kapsách. Pohyb tohoto druhu je velmi charakteristický. Buňky byly rychlé, ale při pohybu se trhaně zastavovaly – vždy okamžik setrvaly nehybně na jednom místě a posléze znovu rychle vyrazily. Plavaly přímo vpřed s ostrými změnami směru. Buňky při pohybu rotovaly, ale vinou rychlého pohybu byla rotace špatně patrná.

Trepomonas rotans Klebs, 1892

Tento druh jsme pozorovali celkem v devíti kulturách (viz tab. 12). Živé buňky byly dlouhé přibližně 12 μm . Byly silně zploštělé a oválného tvaru, zadní konec byl zpravidla širší než přední. Jádra byla lehce protažena do stran, ale byla širší než *T. agilis* nebo *T. steinii*, dohromady tvořila v čele buňky rohličkovitý útvar. Kapsy byly široké, bublinovité a sahaly od zadního konce až do poloviny buňky (viz obr. 10D). Směřovaly k sobě v ostrém úhlu, ale nepřekrývaly se, ani se nestýkaly – byly viditelně odděleny. Ze všech druhů rodu *Trepomonas* byly u tohoto druhu kapsy nejvýraznější. Pod světelným mikroskopem byly nejvíce patrné



Obr. 10: *Trepomonas rotans*. A, B izolát BOL2; C – E izolát FB; F – H izolát MALSE. B, E, H boční pohled; k – kapsa, kb – bičíky v kapsách. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

dva páry bičíků u horních okrajů kapes. První pár směřoval vpřed nebo do stran, druhý šikmo vzad mimo kapsy. Bičíky v kapsách byly velmi špatně viditelné, protože svou délkou nepřesahovaly okraj buňky. Na některých fotografiích byly nicméně pozorovány dva krátké bičíky v každé kapse (viz obr. 10A). Velká část buněk barvených protargolem se obarvila nestandardním způsobem – místo jader a bičíků se obarvila pouze obrysová kontura buňky (viz obr. 15C), což naznačuje možnou přítomnost nějaké povrchové struktury. Buňky se pohybovaly oproti *Trepomonas agilis* a *T. steinii* relativně pomalu. Změny směru byly klidné a plynulé a buňky při pohybu intenzivně rotovaly.

Zbývající druhy rodu *Trepomonas*

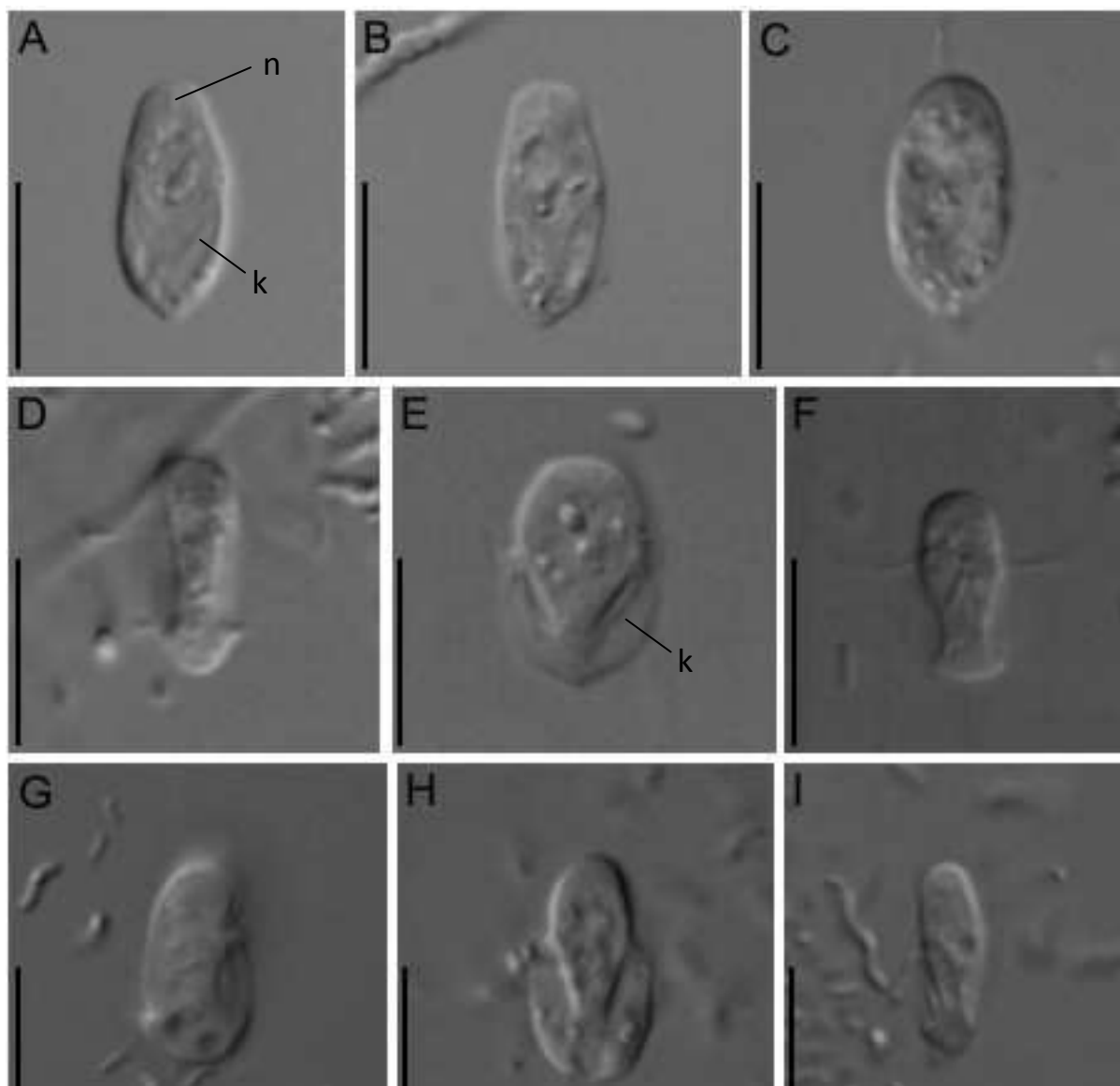
Trepomonas sp. 1

Linie endobiotických trepomonád blízce příbuzná volně žijícímu rodu *T. agilis*. V kultuře obou izolátů (ESMI3 a EUDIA3) byli pozorováni prvoci, kteří byli podle morfologie jednoznačně určeni jako rod *Trepomonas*. Kultury bohužel brzy vymřely, takže bližší studium nebylo možné.

Druhový komplex *Trepomonas* spp. PPS6

Patří sem linie, které jsme označili *Trepomonas* sp. 2, 3 a 4. Skupinu označujeme jako druhový komplex, protože jsme na buňkách nepozorovali žádný výrazný znak, kterým by se mezi sebou jednotlivé linie odlišovaly. Z některých fotografií je zřejmé, že by mohly být rozdíly přinejmenším ve tvaru kapes (viz obr. 11). Morfologických dat z těchto prvků jsme nicméně získali velmi málo a bude potřeba dalších a podrobnějších studií, aby bylo možno vyvodit jednoznačný závěr.

Tyto prvoky jsme pozorovali v celkem 23 kulturách (viz tab. 12) – byly to námi nejčastěji pozorované trepomonády. Buňky byly na vzhledem k ostatním diplomonádám průměrně veliké – měly kolem 11 – 12 μm na délku (viz tab. 13). Buňky měly spíše užší oválný tvar, na zadním konci zpravidla zakončený lehkým zašpičatěním. Jádra byla dobře patrná pouze u izolátu HRAD5, kde byl vidět do stran pouze málo protažený relativně široký tvar (viz obr. 11A). Dobře byla jádra viditelná na protargolových preparátech (viz obr. 15D). Kapsy byly špatně viditelné, zaznamenán byl šterbinovitý i rozšířený téměř kapkovitý



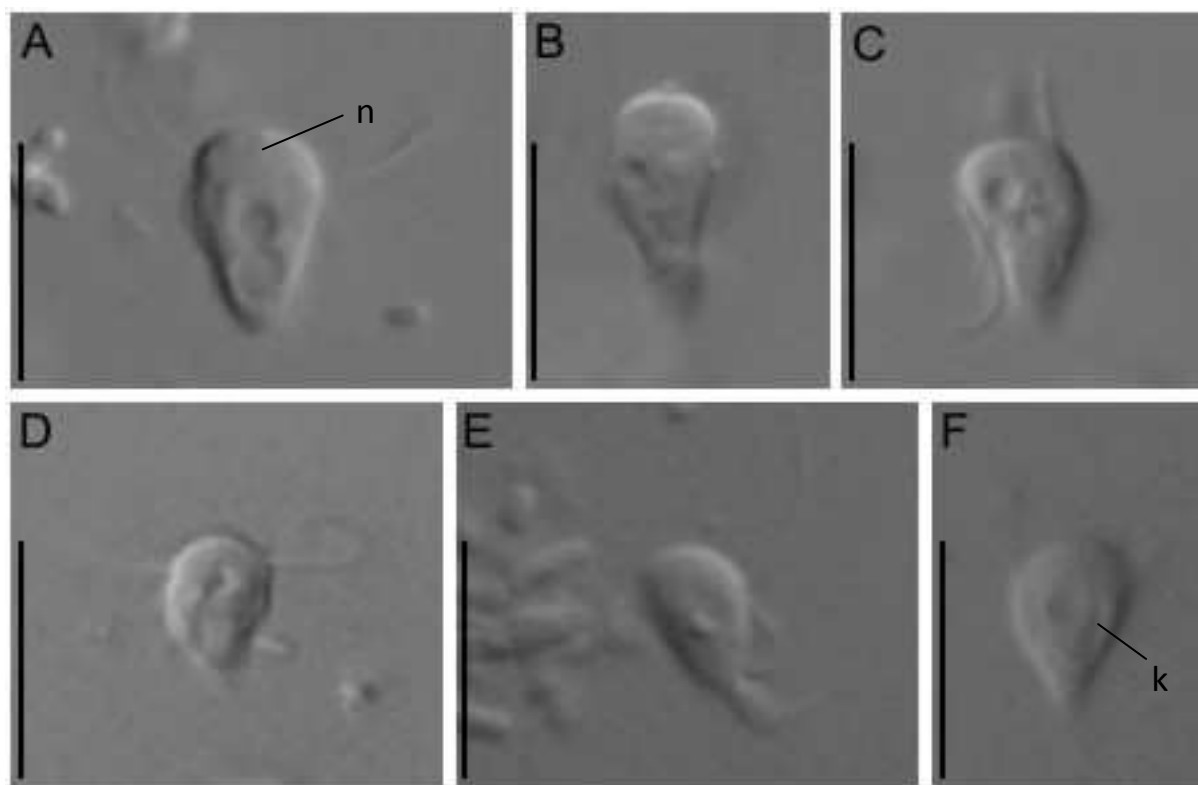
Obr. 11: Komplex *Trepomonas* spp. PPS6. A, B izolát HRAD5; C izolát VIKOS; D izolát VIKOS, boční pohled; E izolát DAR; F izolát DAR, boční pohled; G, H izolát MACHUPICCHU; I izolát MACHUPICCHU boční pohled; n – jádra, k – kapsa. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

tvar. Bičíky byly pozorovány většinou pouze v kapsách, zbylé byly velmi špatně viditelné. Buňky se pohybovaly relativně rychle, bez zastavování a s různě výraznou rotací.

Gyromonas ambulans Seligo, 1886

Diplomonády, které zde zařazujeme do rodu *Gyromonas*, jsme pozorovali ve třech kulturách – GRUBER2, LUH2N a SPINDL2. Byly to nejmenší námi pozorované diplomonády, naměřené délky buněk se pohybovaly kolem 7 μm . Tvar byl primárně trojúhelníkovitý bez spirálního zakroucení. Buňky nicméně často přisedaly k podkladu a objevoval se u nich

metabolický pohyb, při kterém měnily tvar. Často byla během přisednutí viditelná panožka. Navracely se ale vždy zpět do trojúhelníkovité formy. Dvě jádra byla vzhledem k malé velikosti buňky spatřena pouze několikrát (viz obr. 12A). Měla do stran lehce protažený tvar a tvořila dohromady v přední části buňky rohličkovitý útvar. V nejširším místě buňky se nacházely s největší pravděpodobností dva páry bičíků, vzhledem k malému počtu pozorování a získaných fotografií to ale nelze říci s jistotou. Útvary podobné kapsám byly pozorovány pouze jedenkrát (viz obr. 12F). Pohyb tohoto prvka byl nepravidelný a škubavý s častým přisedáním k povrchu. Buňky se zpravidla pohybovaly kolem jednoho místa, na rozdíl od ostatních diplomonád neurazily velkou vzdálenost.

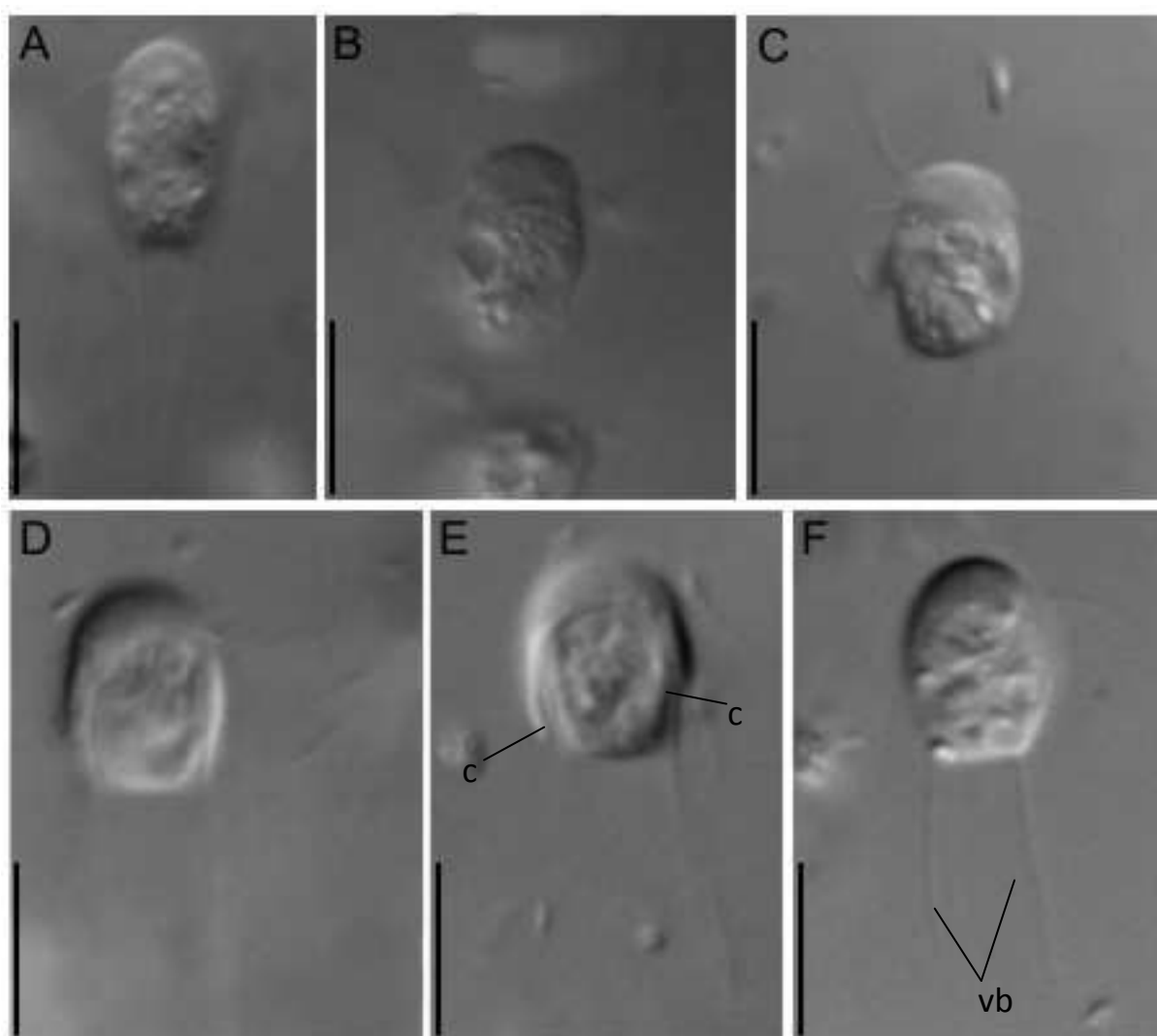


Obr. 12: *Gyromonas ambulans*. A, B izolát URUBAMBA; C – F izolát SPINDL2; n – jádra, k – domnělá kapsa. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .

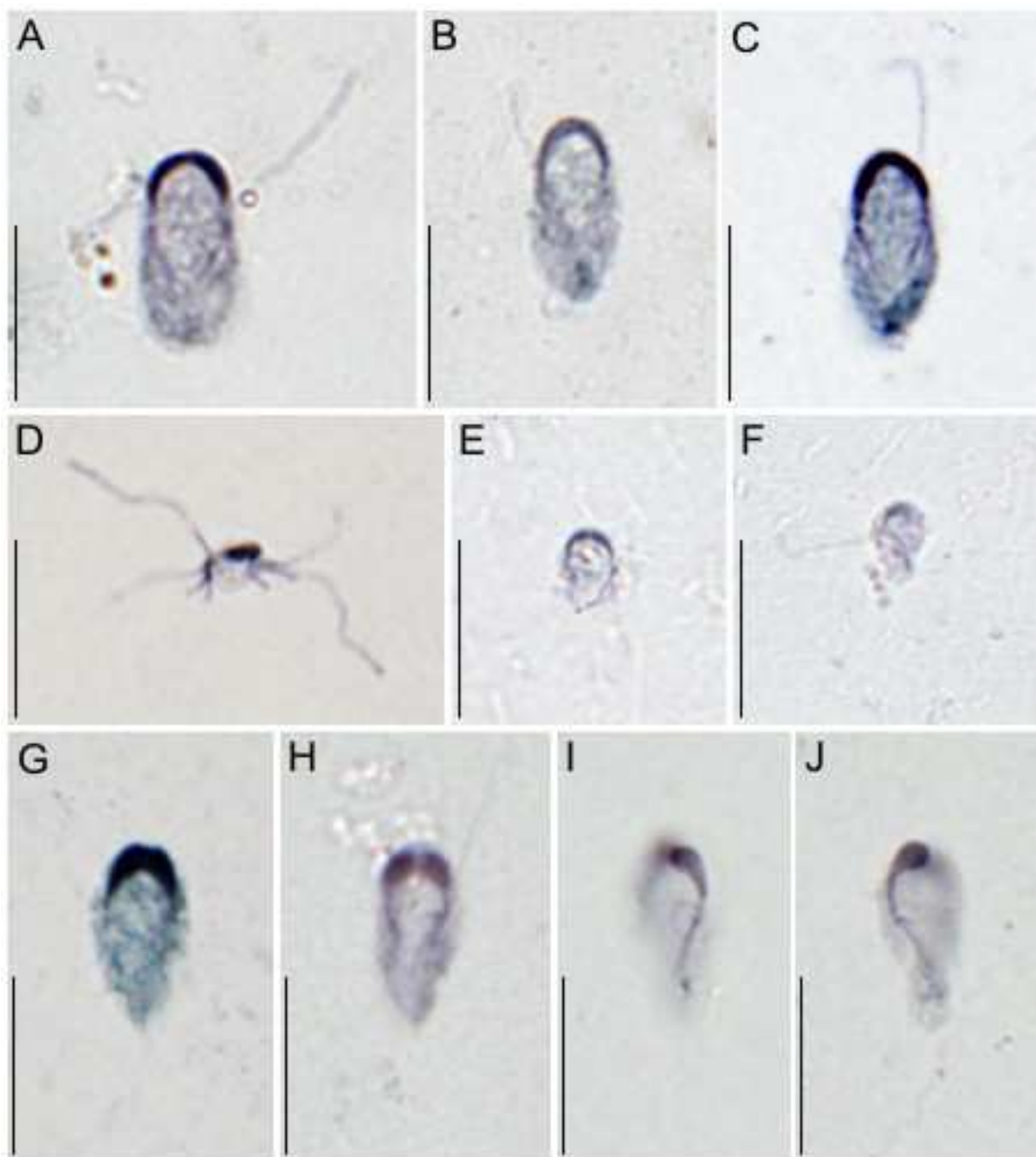
Hexamita spp. Dujardin, 1841

Zástupce tohoto rodu jsme pozorovali celkem asi v deseti kulturách, sekvenci genu pro SSU rRNA jsme určili ze sedmi z nich (viz tab. 12). Vzhledem k obtížné kultivaci a manipulaci (viz diskuzi) se nám nepodařilo získat relevantní množství morfologických dat. Buňky ze všech kultur byly vzhledem k ostatním diplomonádám průměrné až menší délky

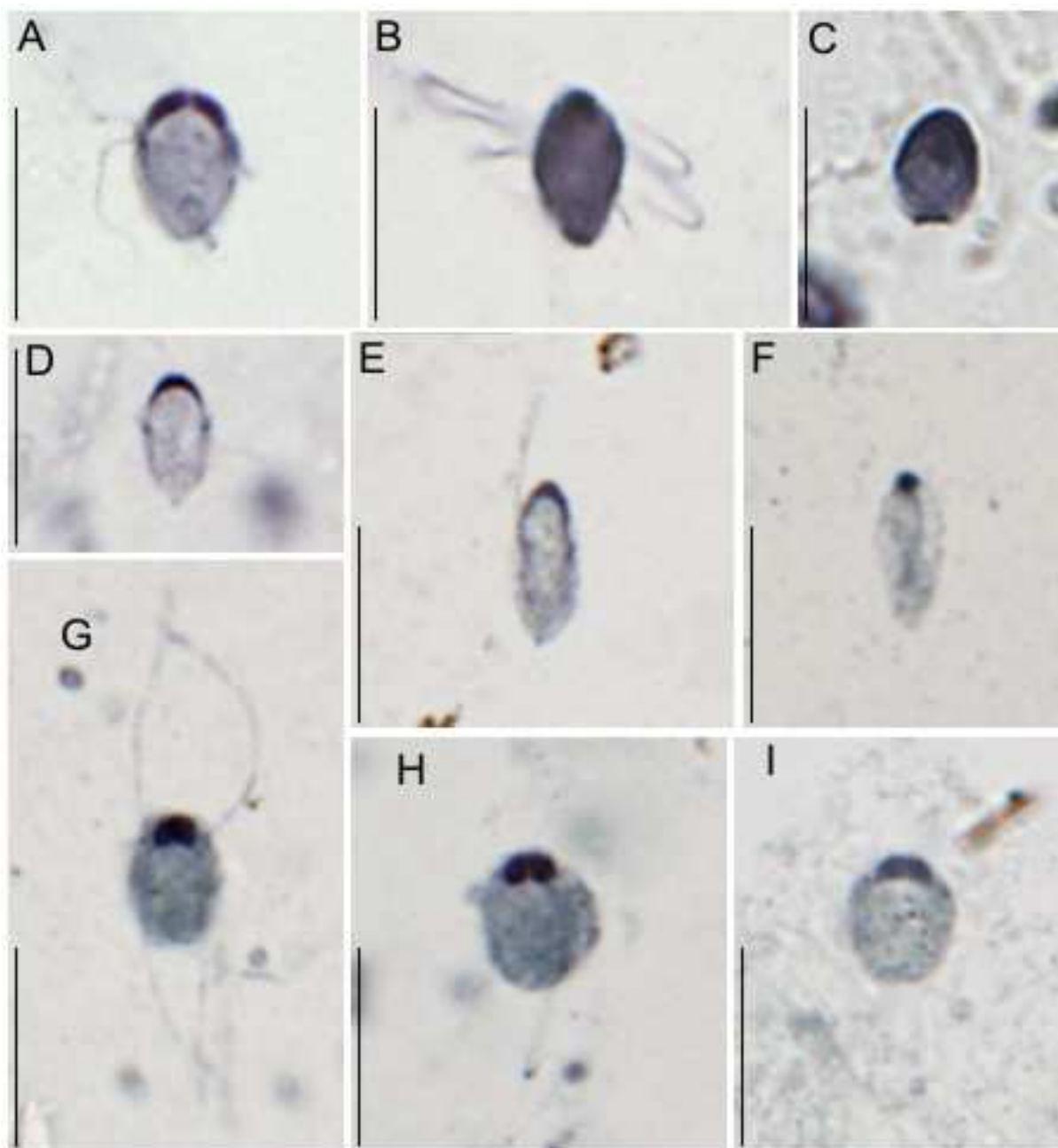
(zpravidla kolem 12 – 14 μm , několikrát byly zaznamenány i znatelně menší; odhad autorky). Nebyly zploštělé, měly vejčitý tvar, vpředu zaoblený, vzadu většinou zarovnaný. Jádra byla na živých buňkách vždy viditelná pouze jako jednolitý útvar v přední části buňky, jednotlivě byla jádra vidět pouze na preparátech barvených protargolem (viz obr. 15). Charakteristickým znakem jsou dva dlouhé vlečné bičíky (viz obr. 13F). Tři páry bičků v přední části buňky byly viditelné jen zřídka. Rovněž trubicovité cytostomy byly viditelné pouze v některých případech u některých izolátů. Všechny hexamity se pohybovaly velmi rychle, nečekaně měnily směr a téměř se nezastavovaly. Rotace buňky byla během pohybu viditelná.



Obr. 13: *Hexamita* sp.. A – C izolát SEB5, n – jádra; D – F izolát KAZACH, c – cytostom, vb – vlečný bičík. Nomarského DIC, živé buňky. Měřítka představují 10 μm .



Obr. 14: Izoláty barvené protargolem. A – C *Trepomonas agilis*, izolát SOOS4; D – F *Trepomonas steinii*, izolát LUH3; G – J *Trepomonas latecapitata*, izolát PETRYB. Měřítka představují 10 μm .



Obr. 15: Izoláty barvené protargolem. A – C *Trepomonas rotans*, A, B izolát FB, C izolát BOL2; D – F *Trepomonas* spp. PPS6, D izolát VIKOS, *Trepomonas* sp. 2, E, F izolát HRAD5, *Trepomonas* sp. 2; G – I *Hexamita* sp., G, H izolát TOLEDO, I izolát TUN2. Měřítka představují 10 μ m.

5. Diskuze

Volně žijící diplomonády se v historii netěšily příliš velkému zájmu odborné veřejnosti. Jednotlivé rody či druhy byly zpravidla objeveny a posléze zmiňovány už pouze v souvislosti s náhodným objevením dalšího druhu v rámci širšího výzkumu nebo s endobiotickými diplomonádami. Rozsáhlejší taxonomické revize se volně žijící diplomonády dočkaly podle všeho pouze jedenkrát, kdy byl zároveň vytvořen určovací klíč, ze kterého jsme v této práci vycházeli (Myl'nikov, 1985). Přitom mohou studie právě na těchto prvocích přispět k pochopení procesu přechodu z volného prostředí do endobiotického a z endobiotického prostředí zpět do volného. Také srovnávací studie morfologie a ultrastruktury unizoických a diplozoických diplomonád by mohla přinést nové poznatky o evoluci eukaryotické buňky. Tito prvoci navíc jsou běžní v různých typech anoxických prostředí, takže opatřit si materiál pro studium není náročné (jeho zpracování je samozřejmě jiným problémem). Když jsme srovnali výsledky fylogenetické analýzy s místy sběru sedimentu jednotlivých izolátů (pokud byla tato informace dostupná), zjistili jsme, že ve většině linií se vyskytují izoláty z přinejmenším dvou kontinentů. (Tam, kde větve tvořily třeba pouze dva izoláty, nebyla vypovídací hodnota těchto informací vysoká, ale i v takovém případě jsme měli jeden izolát z Evropy a jeden ze Severní Ameriky). Domníváme se proto, že většina linií volně žijících diplomonád je kosmopolitní.

5.1. Zhodnocení použitých metod

5.1.1. Kultivace volně žijících diplomonád

V čerstvých kulturách byly diplomonády relativně časté. Díky tomu byla naše sbírka izolátů velmi rozsáhlá – obsahovala trvale více než 35 stabilních kultur, přičemž průběžně ji procházely kultury, které buď brzy zahynuly, anebo z nich byla pouze izolována DNA a byly využity kolegy k výzkumu jiných organismů, které se v nich vyskytovaly. Nejvíce stabilních kultur jsme měli od rodu *Trepomonas*, jehož zástupci tudíž tvoří větší část souboru námi získaných izolátů (viz tab. 12). Kromě toho, že se jednalo o nejčastější zástupce řádu Diplomonadida, byly buňky tohoto rodu nejhouževnatější a zřejmě jim nejvíce vyhovovaly

naše kultivační podmínky. Četnost buněk v kulturách sice často nebyla vysoká, ale jinak běžně dlouhodobě přežívaly a k vymření docházelo zřídka.

Zástupci rodu *Hexamita* byli v kulturách méně obvyklí, ale přitom častější, než jak naznačuje jejich zastoupení v naší fylogenetické analýze. Buňky tohoto rodu zřejmě hůře snášely kultivační podmínky, protože nezřídka došlo k vymření kultury, a to i poté, co se již zdála být stabilní. Zároveň jsme ale měli i kultury, kde hexamity dlouhodobě přežívaly ve vysokých četnostech. Vzhledem k množství kultur, které jsme měli k dispozici, jsme nezkoušeli kultivační podmínky pro rod *Hexamita* optimalizovat.

Nejméně obvyklí byli zástupci rodu *Gyromonas*. Kultury sice dlouhodobě přežívaly, ale nikdy nebyly dostatečně stabilní a vždy hrozilo jejich vymření. Četnost buněk byla v kulturách trvale velmi nízká a docházelo k oscilacím, díky kterým v kulturách často nebyly pozorovány žádné buňky. Po nějaké době od tohoto zdánlivého vyhynutí se nicméně buňky znovu v kulturách objevily. Zda to bylo z cyst nebo z buněk, které tam zbývaly, ale byly přehlédnuty, nevíme.

Často byly kultury smíšené a vyskytovaly se v nich dva nebo více druhů diplomonád. Zpravidla se jednalo o hexamity a jeden druh trepomonád. V takovém případě většinou hexamity časem vymřely. Měli jsme také několik kultur, ve kterých se vyskytovalo více druhů trepomonád naráz nebo hexamita společně s gyromonádou. Tyto smíšené kultury byly dlouhodobě stabilní.

5.1.2. Izolace a amplifikace DNA

Vinou kolísání a nízkých hustot buněk v kulturách jsme se často potýkali s problémem získat dostatečné množství DNA pro amplifikaci genu pro SSU rRNA. Elektroforéza byla po amplifikaci často negativní nebo byl signál jen velmi slabý. Tento problém jsme se snažili kompenzovat jednak sledováním kultur a izolací DNA v době, kdy byly dobře narostlé, a jednak optimalizací reakce PCR a výběrem nejvhodnějších chemikálií a primerů. Zpočátku byl pro PCR reakci několikrát použit LA DNA "Polymerases Mix"(Top-Bio, ČR), nicméně s diplomonádami bylo dosahováno stejně dobrých nebo lepších výsledků s Combi PPP Master Mixem s Taq polymerázou (Fermentas, UK), který byl proto následně používán již trvale. Pro přehled primerů úspěšně používaných při amplifikaci viz kapitolu 3.4.2. Primery

355F a 706R, specifické pro část genu pro SSU rRNA diplomonád, byly před několika lety navrženy Dr. M. Kolískem (nyní University of British Columbia, Vancouver, Kanada).

I přes snahu o optimalizaci podmínek procesu izolace a amplifikace DNA nebyla z některých kultur získána sekvenční data, a to ani po opakovaných pokusech. Příkladem je izolát URUBAMBA (se zástupci rodů *Hexamita* a *Gyromonas*), u kterého byly provedeny dva neúspěšné pokusy o amplifikaci genu pro SSU rRNA, nebo izolát TUN2, u kterého proběhly dokonce celkem čtyři neúspěšné pokusy o amplifikaci DNA. Sekvence ani jednoho z uvedených izolátů proto nemohla být určena. V případě druhého výše zmíněného problémového izolátu byl zarážející fakt, že četnost buněk v kultuře byla dlouhodobě nadprůměrně vysoká (na rozdíl od izolátu URUBAMBA).

V případě opakovaného nezdaru při amplifikaci DNA se nám osvědčilo použít pro amplifikaci *touchdown* PCR (viz kapitolu 3.4.2.). Díky této metodě jsme získali sekvenci z několika problémových izolátů, například ze SPINDL2. Také se nám touto metodou podařilo amplifikovat DNA izolátu LUH2N, jehož kultura je již několik let mrtvá a k dispozici byla DNA uchovaná v mrazničce. Bohužel jsme *touchdown* PCR začali používat až v závěrečných fázích laboratorních prací, a proto jsme ji nestihli aplikovat na všechny problematické izoláty.

Vzhledem k velkému množství izolátů by bylo neefektivní v každém případě smíšené kultury přistupovat ke klonování. Proto jsme se buď takovou kulturou dále nezabývali (zvlášť v případě, že se v ní vyskytovaly buňky více druhů z jednoho rodu), nebo jsme volili postup, při kterém jsme izolovali DNA standardní cestou bez klonování. Pokud byla osekvenována čistá sekvence, zařadili jsme ji do datasetu. Pokud byla osekvenována směs, sekvenci jsme nepoužili a kulturou jsme se dále nezabývali. Klonovali jsme pouze v případě, že se v kultuře vyskytovali prvoci, ze kterých jsme dosud měli minimum dat (například rod *Gyromonas*).

5.1.3. Pořizování snímků živých buněk

Jedním z cílů práce bylo provést morfologickou studii řádu Diplomonadida. Abychom mohli buňky změřit a zároveň porovnávat izoláty mezi sebou, bylo nutné udělat značné množství mikrofotografií. Vzhledem k tomu, že buňky diplomonád jsou malé a velmi pohyblivé, bylo

pořízení použitelných fotografií často náročným úkolem. Protargolem barvené preparáty jsme také fotografovali a měřili, ale kvůli náročnosti přípravy a často malé úspěšnosti této metody barvení nebylo možné zpracovat větší množství izolátů. Buňky barvené protargolem jsou navíc menší než buňky živé, a to v řádu desítek procent, takže jsou sice patrné velikostní poměry mezi druhy, ale o skutečné velikosti buňky se nedozvíme nic. Výhodou barvení protargolem je zviditelnění mnoha struktur, které nejsou na živých buňkách příliš dobře vidět – například jádra a bičíky (viz obr. 14 a 15). Ve výzkumu morfologie tak tato metoda může hrát velmi významnou roli, pokud se zpracuje větší množství izolátů. To ale v čase určeném pro vypracování diplomové práce nelze stihnout.

Bylo tedy nezbytné nalézt metodu, kterou by bylo možno buňky zpomalit nebo zastavit, ale zároveň je nezabít, aby se nedeformovaly. První vyzkoušenou metodou zpomalení bylo potření krycího skla poly-L-lysinem. Tato metoda se neosvědčila, protože ačkoliv se buňky zastavily, začaly se velmi brzy deformovat.

Dalším pokusem o zpomalení až zastavení buněk bylo použití 2% roztoku methylcelulosity. Tato technika se ukázala být úspěšnější než ta předešlá. Přibližně po jedné minutě bylo při pozorování ve světelném mikroskopu patrné zpomalení buněk, v některých případech se buňky přibližně do dvou minut úplně zastavily. Buňky se deformovaly mnohem méně než při použití poly-L-lysinu, navíc byly při vhodném natočení buňky viditelné i bičíky. Značnou nevýhodou ovšem byly výrazné rozdíly v účinnosti. Na větší a pomalejší buňky – například druhu *Trepomonas rotans* – metoda fungovala velmi dobře, buňky se zastavovaly a relativně dlouho držely tvar. Ale například na menší a rychlejší buňky druhu *Trepomonas steinii* methylcelulosa účinkovala velmi málo a buňky byly pouze nepatrně (a pro naše účely nedostatečně) pomalejší. Ke změně nedošlo ani při vyzkoušení 4% roztoku.

Třetí metodou na znehybnění buněk, kterou jsme vyzkoušeli, bylo použití formaldehydu. Ten byl v malém množství, přibližně 0,5 µl, přidán do vzorku (přibližně 5 µl) přímo před pozorováním. Buňky se sice zastavovaly prakticky okamžitě, nicméně docházelo velmi brzy k deformaci a praskání buněk, stejně jako při použití poly-L-lysinu.

Nakonec se při pozorování a fotografování buněk nejvíce osvědčilo nanést na sklo malou kapku média s buňkami, šetrně ji roztáhnout po podložním skle a vydržet přibližně půl minuty, dokud vzorek nezačal na okrajích osychat. Pak bylo přiloženo krycí sklo. Buňky

byly při použití této metody zpomalené a ve většině případů se během dalších přibližně dvou minut zastavovaly a přisedaly ke sklu, aniž by se viditelně deformovaly. Čas, který zbýval po přisednutí buněk na sklo do jejich deformace, nebyl příliš dlouhý (přibližně kolem tří minut), ale byl dostatečný na to, abychom mohli pořídit uspokojivé množství fotografií živých buněk. I tato metoda měla různou účinnost – například buňky druhového komplexu *Trepomonas* spp. PPS6 se zpomalily podstatně méně než buňky ostatních druhů a přisedaly jen v ojedinělých případech. Naproti tomu buňky druhu *Trepomonas rotans* přisedaly relativně brzy a často.

Z výsledků této práce je zřejmé, že naše studium morfologie se soustředilo téměř výhradně na rod *Trepomonas*. Důvodů je několik. Hlavní roli hraje fakt, že zástupci rodu *Trepomonas* se vyskytují v našich kulturách zdaleka nejčastěji a také v nich nejdéle žijí. Kultur se zástupci rodů *Hexamita* a *Gyromonas* jsme získali mnohem méně, navíc některé izoláty nečekaně vymřely nebo byla četnost buněk velmi nízká. Buňky rodu *Trepomonas* jsou také při manipulaci spojené s fotografováním mnohem houževnatější než buňky ostatních volně žijících diplomonád a jejich chování je pro pořizování fotografií podstatně příznivější. Buňky rodu *Hexamita* se brzy začínají deformovat i bez použití jakékoliv výše zmíněné zpomalovací metody. Navíc se pohybují rychleji než buňky rodu *Trepomonas*, a především nepřisedají – v nejlepším případě uvíznou na několik sekund v sedimentu. Během pokusů se nám nepodařilo najít metodu, která by hexamity zpomalila a zároveň ihned nepoškodila. Buňky rodu *Gyromonas* se nepohybují zdaleka tak rychle jako buňky rodu *Hexamita* nebo *Trepomonas* a velmi často přisedají. I tak bylo jejich fotografování problematické, protože jsou velmi malé (měří kolem 7 μm , viz tab. 13) a během přisednutí mění tvar a rychle kmitají.

5.2 Určování druhů

Při určování druhů jsme se drželi několika zdrojů, nejdůležitějšími byly Flagellatenstudien I., kapitola Distomata (Klebs, 1892), a taxonomická revize diplomonád s určovacím klíčem (Mylnikov, 1985). Tyto dvě publikace byly nejbohatším zdrojem informací o morfologii volně žijících diplomonád. Dále jsme nahlíželi zejména do knihy Protozoology (Wenyon, 1926) a Handbook of Protozoology (Kudo, 1931). Všechny další zdroje informací, které jsme použili při určování druhů, jsou uvedeny v kapitole 2.8. Obecně literatury na téma volně

žijících diplomonád není mnoho – většinu informací jsme získávali ze studií většího rozsahu, jejíž součástí volně žijící diplomonády byly – a vyhledat správné zdroje bylo často náročné (a v několika případech zřejmě nemožné). Několikrát jsme se také setkali s uvedením matoucích nebo dokonce mylných informací. Příkladem je uvedení nesprávné délky buňky druhu *Gyromonas ambulans* v Handbook of Protozoology (Kudo, 1931), které nás uvedlo do nejistoty ohledně zařazení prvoka, kterého jsme pozorovali. Autor totiž uvádí délku *G. ambulans* 15 μm , což je přibližně dvakrát více, než kolik jsme naměřili my na buňkách prvoka, kterého jsme považovali za *G. ambulans*. Když jsme nahlédli do originálního popisu tohoto druhu (Seligo, 1886), zjistili jsme, že se zde uvádí 6 – 10 μm , což odpovídalo našim pozorováním.

5.2.1 Určené druhy rodu *Trepomonas*

Celkem jsme podle dostupné literatury určili čtyři druhy rodu *Trepomonas*: *T. agilis*, *T. latecapitata*, *T. steinii* a *T. rotans*. Druhy *T. agilis* a *T. steinii* byly kultivovány v naší laboratoři ještě před zahájením této práce. Druhy *T. rotans* a *T. latecapitata* jsme zaznamenali až v průběhu této studie.

Druh *Trepomonas agilis* byl již koncem 19. století podle velikosti rozdělen na tři variety: var. *angulatus*, var. *communis* a var. *simplex* (Klebs, 1892). Tyto variety byly později uznány jako samostatné druhy (Mylnikov, 1985). Místo *T. agilis* zároveň Mylnikov pro téhož prvoka použil název *T. communis*. Délka buňky variety *communis* (Klebs, 1892) totiž odpovídá délce buňky z originálního popisu druhu *T. agilis* (Dujardin, 1841). V pozdějších publikacích (Bernard et al., 2000) je ale opět používán název *T. agilis*. Nahrazení názvu druhu *T. agilis* za *T. communis* totiž porušovalo pravidla zoologické nomenklatury. Jestliže byly dány jednomu druhu dva názvy, pak má přednost ten název, který byl vytvořen první – v tomto případě je to *Trepomonas agilis*. Izoláty tohoto druhu jsme získali pouze dva. Vzhledem i velikostí odpovídaly popisu z literárních zdrojů. S buňkami vzhledově a velikostně odpovídajícími zbylým dvěma druhům (původně varietám) jsme se ale po celou dobu naší studie nesetkali. Žádná z námi měřených buněk nebyla delší, než 18 μm , přičemž *T. angulatus* je podle popisu dlouhá 30 μm (Klebs, 1892; Mylnikov, 1985). Rovněž jsme nikdy

nezaznamenali zástupce rodu *Trepomonas*, kteří by měřili 7 – 8 μm , což odpovídá popisu *T. simplex* (Klebs, 1892; Mylnikov, 1985).

Druh *T. steinii* byl díky charakteristickému způsobu pohybu vždy velmi snadno rozpoznatelný. Na fylogenetickém stromě se tento druh rozdělil na tři větve, ačkoliv morfologicky je tento druh relativně uniformní. Nezískali jsme ale dostatečné množství morfologických dat, které by mohlo podat relevantní informaci o tom, zda jsou mezi jednotlivými liniemi také rozdíly v morfologii. Na obr. 9 jsou vyobrazeny buňky izolátů z dvou linií toho druhu. Určité rozdíly ve tvaru buňky při bočním pohledu a v postavení kapes jsou viditelné, ale nemáme zdokumentován dostatečně velký reprezentativní vzorek na to, aby bylo možné určit, zda jsou tyto rozdíly stabilní. Nelze ale vyloučit, že se jedná o samostatné druhy. V jednotlivých liniích nebyla patrná ani geografická závislost, ve všech se totiž vyskytovaly izoláty přinejmenším ze dvou kontinentů.

Také druh *Trepomonas rotans* má natolik charakteristické znaky, že ho lze spolehlivě určit na první pohled. Široké bublinovité kapsy, silně zploštělý tvar a intenzivní rotace nás již při prvním setkání s buňkami tohoto rodu nenechaly na pochybách, že se jedná o tento druh.

S druhem *Trepomonas latecapitata* jsme se setkali jako s posledním. Zprvu byl pro nás jeho vzhled matoucí. Podle velikosti, přibližného tvaru i rotace během plavání se bezpochyby jednalo o rod *Trepomonas*, zprvu jsme se podle velikosti domnívali, že se jedná o druh *T. agilis*. Zakroucení buňky bylo ale u tohoto druhu o tolik výraznější než u *T. agilis* i všech ostatních trepomonád, že jsme záhy provedli detailní morfologickou studii, při které jsme zjistili, že mezi pozorovanými buňkami a buňkami *T. agilis* jsou rozdíly. Druh jsme posléze jednoznačně určili podle klíče (Mylnikov, 1985) jako *T. latecapitata*.

5.2.2 Ostatní druhy rodu *Trepomonas*

V průběhu naší práce jsme ale narazili také na izoláty, které jsme podle morfologie z dostupné literatury do druhu určit nedokázali, anebo jsme z nich neměli k dispozici morfologická data.

Linie *Trepomonas* sp. 1 je tvořena endobiotickými trepomonádami, které jsou s vysokou statistickou podporou blízce příbuzné volně žijícímu druhu *T. agilis*. Morfologii se

nepodařilo zdokumentovat, protože kultura zahynula dříve, než jsme se studiem morfologie začali. Na první pohled tyto izoláty patřily do rodu *Trepomonas*, ale u buněk nebyly spočítány bičíky. Je tudíž možné i to, že se jednalo o rod *Trigonomonas*.

Ze všech druhů rodu *Trepomonas* se v našich kulturách nejčastěji objevovali zástupci tří linií (*Trepomonas* sp. 2, 3, 4), které jsou zde souhrnně označeny jako druhový komplex *Trepomonas* spp. PPS6. Ze zástupců tohoto komplexu jsme získali nejvíce sekvenčních dat, naproti tomu jsme ale z této skupiny získali relativně nejméně morfologických dat. Důvodů je několik. Především mnohé z kultur těchto prvoků vymřely dříve, než bylo studium morfologie provedeno, anebo se četnost buněk v kultuře snížila natolik, že nebylo možné s ní dále pracovat. Největším problémem ale bylo samotné pořízení fotografií. Buňky se sice vzhledem k ostatním trepomonádám pohybují průměrně rychle, ale na rozdíl od nich prakticky vůbec nepřisedají, a to ani při použití výše zmíněných zpomalovacích metod. Zpomalení bylo minimální (při použití šetrnějších metod) nebo se buňky ihned deformovaly. Proto bylo pořízení fotografií ve větším zvětšení, které by dovolovalo zaznamenání detailů, spíše dílem náhody, pokud buňka uvízla v sedimentu nebo neočekávaně přisedla. Pro získání fotografií sloužících k měření délky buněk, na které nebyly tak vysoké kvalitativní požadavky, byla používána metoda sériového fotografování za pohybu buňky. Z množství výsledných fotografií pak byly vybrány ty, na kterých bylo možné provést měření.

Na první pohled byly vzhled i pohyb všech sledovaných izolátů komplexu *Trepomonas* spp. PPS6 relativně homogenní bez výrazných odchylek, které by odlišovaly tři větve komplexu od sebe nebo celý komplex od ostatních trepomonád. Výsledky měření ukázaly téměř stejné velikosti buněk ve všech třech větvích (kromě izolátu HRAD5AN, jehož buňky jsou o něco větší). Ze získaných detailních fotografií je patrné, že morfologické rozdíly mezi jednotlivými větvemi jsou (viz obr. 11) – například ve tvaru buňky nebo kapes. Vzhledem k nedostatku kvalitních fotografií a malému reprezentativnímu vzorku ale nelze určit, zda jsou tyto rozdíly stabilní.

Zpočátku jsme se při pokusech o určení druhů domnívali, že by některá větev druhového komplexu mohla být jednou z morfologických variet *Trepomonas agilis*. Po srovnání získaných hodnot délky buněk s literaturou jsme ale zjistili, že se naše naměřené údaje v podstatě nepřekrývají ani s jednou varietou. Pouze HRAD5AN svou délkou těsně zasahuje do intervalu charakterizující *T. communis*, tato varieta (druh) byla nicméně uznána

jako synonymum *T. agilis* (Bernard et al., 2000), se kterou tento izolát není blízce příbuzný. V současné době se proto domníváme, že se jedná o několik nových, dosud nepopsaných druhů, které se nám z neznámých důvodů objevují v kulturách nejčastěji ze všech trepomonád. Je možné, že se jedná o organismy, které jsou málo abundantní (i když široce rozšířené) v přírodě, ale jsou kultivovatelné mnohem snadněji než ostatní volně žijící diplomonády. Naše pracovní hypotéza je, že se jedná o tři samostatné druhy, ale bude třeba provést další studie (zejména morfologické), aby bylo možné určit, o kolik druhů se jedná a zda jsou tyto druhy dosud nepopsané. Také bude nutno zjistit, zda je komplex *Trepomonas* PPS6 skutečně polyfyletický, jak naznačují výsledky našich analýz.

5.2.3 Rod *Hexamita*

Zástupce rodu *Hexamita* jsme do druhu neurčovali. Po prvních pokusech o pořizování fotografií diplomonád se naše práce více zaměřila na rod *Trepomonas*, se kterým se snáze manipulovalo (viz kapitolu 5.1.3.) a od kterého jsme měli větší množství izolátů. Buňky rodu *Hexamita* jsme tudíž pozorovali zejména při pokusech o zpomalení či zastavení buněk nebo při pravidelné kontrole kultur. Během těchto pozorování jsme zaznamenali rozdíly v morfologii buněk mezi izoláty. Tyto rozdíly se týkaly velikosti, tvaru (bylo pozorováno několik izolátů, jejichž buňky měly spíše kulovitý tvar, zatímco ostatní druhy měly tvar přibližně vejčitý) a viditelnosti trubicovitých cytostomů. Podrobná morfologická studie tohoto rodu by nicméně mohla proběhnout pouze za předpokladu, že by byla nalezena metoda, jak živé buňky bez poškození alespoň zpomalit. Výsledky naší fylogenetické analýzy ale naznačují, že naše izoláty patří nejméně do čtyř druhů.

5.2.4 Rod *Gyromonas*

Buňky rodu *Gyromonas* se v našich kulturách vyskytovaly ve velmi nízkých hustotách, což podrobnou morfologickou studii značně ztěžovalo. Velikost námi naměřených buněk (viz tab. 13) odpovídala prvnímu popisu toho rodu, konkrétně druhu *Gyromonas ambulans* (Seligo, 1886). V tomto popisu autor také uvádí, že buňky mají čtyři bičíky, což my ale o námi pozorovaných buňkách nemůžeme s jistotou tvrdit. Na našich fotografiích byl často patrný jeden pár bičíků. Občas byly viditelné také struktury, které připomínaly bičíky

druhého páru, nicméně zároveň se mohlo jednat o tentýž bičík zachycený kvůli pomalejší expozici a rychlému pohybu na dvou místech zároveň. Kudo (1931) ve svém popisu tohoto rodu uvádí, že cytostomy nebyly viditelné. My jsme naopak několikrát pozorovali na buňkách útvary, které by cytostomy mohly být (viz obr. 12).

Druh *Gyromonas ambulans* byl nalezen na severní polokouli ve sladkých vodách (např. Hänel, 1979), zatímco druhý druh tohoto rodu, *Gyromonas salinus*, byl nalezen u Austrálie v moři (Ruinen 1938, cit. podle Lee, 2005). Buňky rodu *Gyromonas salinus* jsou navíc o něco větší. Především s ohledem na habitat jsme tudíž určili námi nalezené izoláty jako druh *Gyromonas ambulans*.

5.3. Evoluce volně žijících diplomonád

Na našem fylogenetickém stromě založeném na genu pro SSU rRNA vyšlo nezanedbatelné množství uzlů bez statistické podpory, což činí naše výsledky místy diskutabilní. I přesto je z našich výsledků zjevné, že se ve fylogenetických vztazích volně žijících diplomonád zřejmě vyskytuje několik zajímavých fenoménů.

Prvním z nich je fakt, že rod *Trepomonas* velmi pravděpodobně není monofyletický. V naší analýze se druh *Trepomonas rotans* umístil do blízkosti linií I a II rodu *Hexamita*. Také v průběžných analýzách, které jsme během této studie prováděli, se *T. rotans* vždy větvila mimo rod *Trepomonas* a přisedala do blízkosti hexamit. Ostatní druhy rodu *Trepomonas* vytvořily na fylogenetickém stromě linii, které není *T. rotans* příbuzná (viz obr. 6). Ačkoliv nebyly ani příbuznost *T. rotans* rodu *Hexamita* ani monofylie linie tvořené ostatními trepomonádami statisticky podpořeny, znamenají naše výsledky nejspíš to, že *T. rotans* ve skutečnosti nepatří do rodu *Trepomonas*. Od ostatních druhů, ze kterých jsou k dispozici sekvenční data, se navíc *T. rotans* liší i morfologicky. Všechny ostatní trepomonády měly spirálně zakroucenou buňku, *T. rotans* nikoliv. Buňky *T. rotans* byly silně zploštělé a měly velké bublinovité kapsy, které jsme u ostatních druhů trepomonád nepozorovali. Během prvních pokusů o studium ultrastruktury buněk *T. rotans* jsme zaznamenali těsně u povrchu struktury připomínající šupiny. Že by tento druh mohl mít buňku něčím pokrytou, naznačovalo také množství protargolových preparátů, na nichž se buňky obarvily nestandardním způsobem. Místo jader a bičíků se zviditelnila pouze obrysová kontura

buněk (viz obr. 15C). U ostatních druhů trepomonád jsme se s tímto způsobem obarvení buňky nesetkali. Je tedy možné, že by se mohlo jednat o další znak, kterým se *T. rotans* odlišuje od ostatních trepomonád. Druhou možností samozřejmě může být, že je *T. rotans* odvozeným druhem (jak geneticky, tak morfologicky) a umístění tohoto druhu do blízkosti rodu *Hexamita* bylo artefaktem analýzy genu pro SSU rRNA. Ačkoliv se *T. rotans* od ostatních trepomonád liší v mnoha ohledech, stále je tomuto rodu morfologicky nejpodobnější. Jednak uspořádáním a délkami bičíků a jednak otevřenými cytostomálními kapsami. Morfologie těchto kapes je sice odlišná od ostatních druhů rodu *Trepomonas*, nicméně trepomonády jsou jedinou popsanou skupinou diplozoických diplomonád, která má cytostomy takto otevřené a je v nich umístěn více než jeden bičík.

Také rod *Hexamita* se rozdělil na nepříbuzné linie, celkem čtyři, které jsme označili I – IV. Ačkoliv jednotlivé linie byly většinou dobře podpořeny (kromě linie III), pozice žádné z nich neměla významnou statistickou podporu. Rovněž v průběžných analýzách se hexamity větvily na více nepříbuzných skupin. U izolátů všech těchto skupin jsme sice pozorovali morfologii rodu *Hexamita* (velikost a tvar těla, rychlost a způsob pohybu), ale protože jsme neprovedli podrobnou morfologickou analýzu tohoto rodu, nemůžeme říci, zda a jaké jsou mezi skupinami morfologické rozdíly. Linie I a III byly tvořeny jak volně žijícími, tak endobiotickými zástupci, linie II a IV byly tvořeny výhradně volně žijícími zástupci. Linie IV byla tvořena dvěma větvemi. Podle našich záznamů a informací o environmentálních sekvencích v *GenBank* je linie s izolátem KAMERUN4 sladkovodní, zatímco linie s izoláty AYEN, KLOSTERSEE a NORSKO by mohla být brakická či mořská. Tyto informace se nám nicméně u izolátů AYEN a KLOSTERSEE nepodařily dohledat – kolegové, kteří tyto izoláty sebrali, si přesné místo sběru nepamatovali, takže to nelze říci s jistotou. I když pozice jednotlivých větví nejsou v naší analýze statisticky podpořeny, nemusí být rozdělení tohoto rodu do několika oddělených skupin artefaktem analýzy. Vzhled buněk rodu *Hexamita* by také mohl být plesiomorfni a zachovat se u několika jinak nepříbuzných větví diplomonád.

Přitahování větve *Spironucleus muris/S.meleagridis* do blízkosti druhu *Trepomonas latecapitata* se vyskytlo nejen ve finální Bayesovské analýze, ale i v analýzách průběžných. Tento jev může být samozřejmě artefaktem analýzy – sekvence izolátu *T. latecapitata* BEAVER3 je totiž krátká, asi o 670 bází kratší než druhý izolát PETRYB. Na druhou stranu

tato linie rodu *Spironucleus* se řadila na různé pozice uvnitř skupiny Hexamitinae ve více studiích (Jørgensen, 2007; Kolisko, 2008). Je proto možné také to, že se opravdu jedná o samostatnou linii, která je rodu *Spironucleus* nepříbuzná, ale má stejný vzhled buněk (který se buď v evoluci zachoval, nebo vznikl konvergentně). Jednalo by se tak o další linii endobiotických diplomonád blízce příbuzných volně žijícím, kterých v naší analýze vyšlo několik (viz níže).

Izolát CERAT3 zřejmě představuje novou linii unizoických diplomonád sesterskou linii PSEUD/PYX/TIPLICE/SCHULTZ. Tato pozice vyšla podpořena pouze v Bayesovské analýze, v ML byla bez statistické podpory. Podrobná studie morfologie zástupců této linie nebyla dosud provedena. Kultury izolátů TIPLICE a SCHULTZ vymřely, takže studie již není možná, a z izolátu CERAT3 jsou dostupné protargolem barvené preparáty, které ale ještě nebyly zpracovány. Z dostupných dat tak lze o zástupcích této linie říci pouze to, že se pravděpodobně jedná unizoické endobiotické diplomonády.

Izolát VAV2A, ve kterém byly pozorovány unizoické buňky, byl odebrán ze zrušeného septiku. Nevíme proto jistě, zda je endobiotický nebo volně žijící. Tento izolát se na fylogenetickém stromě umístil dovnitř rodu *Trimitus*, konkrétně do blízkosti jeho endobiotických zástupců. Protože má ale rod *Trimitus* také volně žijící zástupce (Kolisko et al., 2008) a tato pozice izolátu VAV2A nebyla statisticky podpořena, nelze z těchto výsledků ohledně jeho způsobu života nic vyvozovat. Jedná se ale o první nález unizoických diplomonád v septiku.

Rod *Gyromonas* se s vysokou podporou umístil jako blízký příbuzný rodu *Trimitus*. Volně žijící diplozoické gyromonády jsou tedy příbuzné většinou endobiotickým unizoickým diplomonádám – jedná se o první takový případ s vysokou statistickou podporou. Předpoklad, že by rod *Gyromonas* mohl být sekundárně volně žijící, je tudíž nasnadě. Tato pozice rovněž naznačuje, že by rod *Gyromonas* mohl být jednou ze samostatně vzniknuvších linií diplozoických diplomonád. Nelze však vyloučit ani opačný scénář, kdy by linie rodu *Trimitus* vznikla jakýmsi rozpůlením diplozoických buněk s morfologií podobné rodu *Gyromonas*. Rody *Gyromonas* a *Trimitus* se proto nabízejí jako předměty studia ultrastruktury, procesu dělení buněk a s ním spojené flagelární transformace. Vzájemná srovnání výsledků takových studií by mohla pomoci k pochopení vzniku diplozoické buňky nebo potažmo její redukci na buňku unizoickou nebo naopak.

Naše analýza genu pro SSU rRNA umístila hned v několika případech do blízkosti volně žijících druhů endobiotické diplomonády. Konkrétně se jednalo o endobiotickou linii *Trepomonas* sp. 1, která se s vysokou podporou umístila jako blízce příbuzná volně žijícímu druhu *Trepomonas agilis*, dále endobiotické izoláty hexamit PI1kl3 a PI1kl izolované z pijavky koňské a větvíci se uvnitř druhu *Hexamita inflata* (rovněž s vysokou podporou), a volně žijící izolát SEB5, který se umístil jako blízce příbuzný endobiotickému druhu *Hexamita nelsoni* (ovšem bez podpory). Podobný stav pak lze nalézt ještě u rodu *Trimitus*, kde se v dřívější analýze k dosud endobiotickému rodu přidaly dva nové volně žijící izoláty (Kolisko et al., 2008). Fakt, že se na tolika místech odvětvují endobiotické linie ve volně žijících a naopak, značně komplikuje představu o evoluci způsobu života diplomonád. Existují dvě možnosti výkladu. V první z nich se ze sekundárně volně žijících prvoků znovu vyvinuly endobiotické linie. Druhá možnost je, že se sekundárně volně žijící linie vyvinuly mnohokrát nezávisle. První varianta evoluce se nám zdá přijatelnější. Transformace volně žijícího prvoka k endobiotickému způsobu života se zdá být jednodušší a pravděpodobnější, než přeměna odvozeného endobionta přizpůsobeného vnitřnímu prostředí na volně žijícího zástupce.

6. Závěrečné shrnutí

- Bylo určeno celkem 65 nových sekvencí genu pro SSU rRNA převážně volně žijících diplomonád.
- Skupina Hexamitinae vyšla v analýze monofyletická.
- Rod *Trepomonas* se rozpadl na dvě nepříbuzné linie a rod *Hexamita* na čtyři. Také unizoické diplomonády byly tvořeny více oddělenými skupinami.
- Byla objevena skupina izolátů rodu *Trepomonas*, kterou nebylo možné podle dostupné literatury určit do druhu. Zřejmě se jedná o tři nové, dosud nepopsané druhy.
- V několika liniích diplomonád se vyskytli s vysokou podporou blízce příbuzní volně žijící a endobiotičtí zástupci diplomonád.
- Diplozoický rod *Gyromonas* se umístil jako blízce příbuzný unizoickému rodu *Trimitus*.
- Izolát CERAT3 vytvořil novou linii unizoických diplomonád.
- Podrobně jsme prostudovali morfologii druhů *Trepomonas agilis*, *T. latecapitata*, *T. rotans*, *T. steinii* a *Gyromonas ambulans*.
- Morfologie rodu *Hexamita* nebyla detailně studována.

7. Přehled použité literatury

* značí sekundární citace

Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 447–475.

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **59**: 429-493.

Bernard C, Simpson AGB, Patterson DJ (2000) Some free-living flagellates (Protista) from anoxic habitats. *Ophelia* **52**: 113-142.

Brugerolle G, Müller M (2000) Amitochondriate flagellates. In Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The Flagellates. Unity, diversity and evolution*. Taylor & Francis Limited, Londýn, Velká Británie, pp 166-185.

Brugerolle G (1986) Séparation des genres *Trimitus* (Diplomonadida) et *Tricercomitus* (Trichomonadida) d'après leur ultrastructure. *Protistologica* **22**: 31-37.

Brugerolle G, Regnault J (2001) Ultrastructure of the enteromonad flagellate *Caviomonas mobilis*. *Parasitology Research* **87**: 662–665.

Brugerolle G (1975) Etude ultrastructurale du genre *Enteromonas* da Fonseca (Zoomastigophorea) et révision de l'ordre des Diplomonadida Wenyon. *Journal of Protozoology* **22**: 468-475.

Cavalier-Smith T (2003) The excavate protozoan phyla Metamonada Grassé emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, *Carpediemonas*, Eopharyngia) and Louksozoa emend. (Jakobea, *Malawimonas*): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematics and Evolutionary Biology* **53**: 1741–1758.

Cavalier-Smith T (1983) A 6-kingdom Classification and a Unified Phylogeny. In W. Schwemmler and H. E. A. Schenk (eds), *Endocytobiology II*. de Gruyter, pp 1027-1034.

Cepicka I, Kostka M, Uzlikova M, Kulda J, Flegr J (2008) Non-monophyly of Retortamonadida and high genetic diversity of the genus *Chilomastix* suggested by analysis of SSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**: 770-775.

***Cleveland LR** (1963) Functions of flagella and other centrioles in cell reproduction. In Levine, L. (ed.) *The cell in mitosis*. Academic Press, Inc., New York, pp 3–53.

Desser SS, Hong H, Siddall ME, Barta JR (1993) An ultrastructural study of *Brugeroelleia algonquinensis* gen. nov. sp. nov. (Diplomonadina, Diplomonadida), a flagellate parasite in the blood of frogs from Ontario, Canada. *European Journal of Protistology* **29**: 72-80.

Dobell C, Leidlaw PP (1926) On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. *Parasitology* **18**: 283–318.

Dujardin F (1841) Histoire naturelle des zoophytes. Infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux, et la manière de les étudier à l'aide du microscope. *Librairie Encyclopédique de Roret*, Paříž, Francie, pp 294-297.

Grassé PP (1952) Classe des zooflagellés: Zooflagellata ou Zoomastigina (Euflagellata Claus 1887). In Grassé PP (ed) *Traité de Zoologie*, Paříž, Francie.

Gray MW (2012) Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* DOI: 10.1101.

Hampl V, Silberman JD, Stechmann A, Diaz-Triviño S, Johnson PJ, Roger AJ (2008) Genetic Evidence for a Mitochondriate Ancestry in the 'Amitochondriate' Flagellate *Trimastix Pyriformis*. *PLoS one* **1**: e1383.

Hampl V, Horner DS, Dyal P, Kulda J, Flegr J, Foster PG, Embley TM (2005) Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for Metamonada and Excavata. *Molecular Biology and Evolution* **22**: 2508–2518.

Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB, Roger AJ (2009) Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *PNAS* **106**: 3859–3864.

Hänel K. (1979) Systematics and ecology of colourless flagellates in sewage. *Archiv für Protistenkunde* **121**: 73-137.

Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Current Biology* **7**: 995-998.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian Inference of Phylogenetic Trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755.

Jelström-Hultqvist J, Einarsson E, Xu F, Hjort K, Ek B, Steinhilber D, Hultenby K, Bergquist J, Andersson JO, Svärd SG (2013) Hydrogenosomes in the diplomonad *Spironucleus salmonicida*. *Nature communications* DOI: 10.1038/ncomms3493.

Jørgensen A, Sterud E (2007) Phylogeny of *Spironucleus* (Eopharyngia: Diplomonadida: Hexamitinae). *Protist* **158**: 247-254.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**: 3059-3066.

Keeling PJ, Brugerolle G (2006) Evidence from SSU rRNA Phylogeny that *Octomitus* is a Sister Lineage to *Giardia*. *Protist* **157**: 205-212.

Klebs G. (1892) Flagellatenstudien II. *Zeischrift für Wissenschaftliche Zoologie* **55**: 329-350.

Kolisko M, Silberman JD, Cepicka I, Yubuki N, Takishita K, Yabuki A, Leander BS, Inouye I, Inagaki Y, Roger AJ, Simpson AGB (2010) A wide diversity of previously undetected free-living relatives of diplomonads isolated from marine/saline habitats. *Environmental Biology* **12**: 2700–2710.

Kolisko M, Cepicka I, Hampl V, Leigh J, Roger AJ, Kulda J, Simpson AGB, Flegr J (2008) Molecular phylogeny of diplomonads and enteromonads based on SSU rRNA, alpha-tubulin

and HSP90 genes: Implications for the evolutionary history of the double karyomastigont of diplomonads. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 205–218.

Kolisko M, Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J (2005) The phylogenetic position of enteromonads: a challenge for the present models of diplomonad evolution. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* **55**: 1729–1733.

Kudo RR (1931) Handbook of Protozoology. *Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA*, pp 161-163.

Kulda J, Nohýnková E (1978) Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Kreier, JP (ed.) *Parasitic Protozoa. Academic Press, New York* **2**: 1–138.

Lee WJ, Simpson AGB, Patterson DJ (2005) Free-living Heterotrophic Flagellates from Freshwater Sites in Tasmania (Australia), a Field Survey. *Acta Protozoologica* **44**: 321-350.

Lee WJ (2006) Some Free-Living Heterotrophic Flagellates from Marine Sediments of Tropical Australia. *Ocean Science Journal* **41**: 75-95.

Lindmark DG, Müller M (1973) Hydrogenosome, a cytoplasmatic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 7724–7728.

***Melkonian M, Reize IB, Preisig HR** (1987) Maturation of a flagellum/basal body requires more than one cell cycle in algal flagellates: studies on *Nephroselmis olivacea* (Prasinophyceae). In Wiessner W, Robinson DG, Starr RC (eds) *Algal development: molecular and cellular aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Německo, 102–113.

Millet COM (2013) Mitochondria-derived organelles in the diplomonad fish parasite *Spironucleus vortens*. *Experimental Parasitology* **135**: 262-273.

Müller M (1993) The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* **139**: 2879-2889.

Mylnikov AP (1985) A key to free-living flagellates of order Diplomonadida (Wenyon) Brugerolle. In Jakovlev VN (ed) *Aquatic communities and hydrobiont biology* Nauka, Leningrad, Rusko, pp 174-198.

- Nohýnková E, Tůmová P, Kulda J** (2006) Cell division of *Giardia intestinalis*: flagellar developmental cycle involves transformation and exchange of flagella between mastigonts of a diplomonad cell. *Eukaryotic Cell* **5**: 753–761.
- Park JS, Kolisko M, Heis AA, Simpson AGB** (2009) Light microscopic observations, ultrastructure, and molecular phylogeny of *Hicanonectes teleskopos* n. g., n. sp., a deep-branching relative of Diplomonads. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **56**: 373–384.
- Philippe H, Germot, A** (2000) Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: Long-branch attraction and models of sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 830–834.
- Philippe H, Lopez P, Brinkmann H, Budin K, Germot A, Laurent J, Moreira D, Müller M, Le Guyader H** (2000) Early-branching or fast evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proceedings of the Royal Society of London* **267**: 1213–1221.
- Poynton SL, Morrison CM** (1990) Morphology of diplomonad flagellates: *Spironucleus torosa* n. sp. from Atlantic cod *Gadus morhua* L. & haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) and *Hexamita salmonis* Moore from brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Journal of Protozoology* **37**: 369–383.
- Poynton SL, Fard MRS, Jenkins J, Ferguson HW** (2004) Ultrastructure of *Spironucleus salmonis* n. comb. (formerly *Octomitus salmonis* sensu Moore 1922, Davis 1926, and *Hexamita salmonis* sensu Ferguson 1979), with a guide to *Spironucleus* species. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**: 49–64.
- Poynton SL, Fraser W, Francis-Floyd R, Rutledge P, Reed P, Nerad TA** (1995) *Spironucleus vortens* n. sp. from freshwater angel fish *Pterophyllum scalare*: morphology and culture. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **42**: 731–742.
- Roger AJ, Svärd SG, Tovar J, Clark CG, Smith MW, Gillin FD, Sogin ML** (1998) A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 229–234.

Roger AJ, Clark CG, Doolittle WF (1996) A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 14618-14622.

***Ruinen J** (1938) Notizen über Salzflagellates. II. Über die Verbreitung der Salzflagellaten. *Archiv für Protistenkunde* **90**: 210-258.

Seligo A. (1886) Untersuchungen Über Flagellaten. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **4**: 145-179.

Siddall ME, Brooks DR, Desser SS (1993) Phylogeny and the Reversibility of Parasitism. *Evolution* **47**: 308-313.

Siddall ME, Hong H, Desser SS (1992) Phylogenetic analysis of the Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle, 1975: Evidence for heterochrony in protozoa and against *Giardia lamblia* as a “missing link”. *Journal of Protozoology* **39**: 361–367.

Silberman JD, Simpson AGB, Kulda J, Cepicka I, Hampl V, Johnson PJ, Roger AJ (2002) Retortamonad flagellates are closely related to Diplomonads—implications for the history of mitochondrial function in Eukaryote evolution. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 777–786.

Simpson AGB, Patterson DJ (2001) On core jakobids and excavate taxa: The ultrastructure of *Jakoba incarcerata*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **48**: 480-492.

Simpson AGB, Roger AJ, Silberman JD, Leipe DD, Edgcomb VP, Jermini LS, Patterson DJ, Sogin ML (2002) Evolutionary history of “early-diverging” Eukaryotes: The Excavate taxon *Carpodomonas* is a close relative of *Giardia*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 1782–1791.

Simpson AGB, Patterson DJ (1999) The ultrastructure of *Carpodomonas membranifera* (Eukaryota) with reference to the “Excavate hypothesis”. *European Journal of Protistology* **35**: 353–370.

Simpson AGB (2003) Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* **53**: 1759–1777.

Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: An unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**: 75–77.

Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.

Sterud E, Mo TA, Peppe TT (1997). Ultrastructure of *Spironucleus barkhanus* n. sp. (Diplomonadida: Hexamitidae) from grayling *Thymallus thymallus* (L.) (Salmonidae) and Atlantic salmon *Salmo salar* L. (Salmonidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**: 399–407.

Tachezy J, Sánchez LB, Müller M (2001) Mitochondrial Type Iron-sulfur Cluster Assembly in the Amitochondriate Eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as Indicated by the Phylogeny of IscS. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1919–1928.

Takishita K, Kolisko M, Komatsuzaki H, Yabuki A, Inagaki Y, Cepicka I, Smejkalová P, Silberman JD, Hashimoto T, Roger AJ, Simpson AGB (2012) Multigene phylogenies of diverse *Carpodomonas*-like organisms identify the closest relatives of ‘amitochondriate’ diplomonads and retortamonads. *Protist* **163**: 344–355.

Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* **426**: 172–176.

Tovar J, Fischer A, Clark CG (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* **32**: 1013–1021.

Wenyon CM (1926) Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologists, vol. 1. *William Wood and company*, New York, USA, pp 684–714.

Yubuki N, Inagaki Y, Nakayama T, Inouye I (2007) Ultrastructure and ribosomal RNA phylogeny of the free-living heterotrophic flagellate *Dysnectes brevis* n. gen., n. sp., a new member of the Fornicata. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **54**: 191–200.

Yubuki N, Simpson AGB, Leander BS (2013) Comprehensive Ultrastructure of *Kipferlia bialata* Provides Evidence for Character Evolution within the Fornicata (Excavata). *Protist* **164**: 423–439.